

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

ΒΙΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΟΡΝΙΘΕΙΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΑΠΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ Δ. ΣΑΚΑΡΙΔΗΣ

Κτηνίατρος, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

2011

**ΒΙΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΟΥ ΟΡΝΙΘΕΙΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΑΠΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ**

ΙΩΑΝΝΗΣ Δ. ΣΑΚΑΡΙΔΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποβλήθηκε στην Κτηνιατρική Σχολή,
Τομέας Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης
Ημερομηνία Προφορικής Εξέτασης:

Συμβουλευτική Επιτροπή

Παύλος - Ρωμύλος Κοϊδης

Καθηγητής, επιβλέπων

Ιωάννης Αμβροσιάδης

Καθηγητής, μέλος

Νικόλαος Σούλτος

Αν. Καθηγητής, μέλος

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. Κοϊδης, Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Ι. Αμβροσιάδης, Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Ν. Σούλτος, Αν. Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Α. Παπά, Αν. Καθηγήτρια	Ιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Ε. Ιωσηφίδου, Αν. Καθηγήτρια	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Ε. Παπαβέργου, Επ. Καθηγήτρια	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Χ. Δόβας, Λέκτορας	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

“Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής υπό της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης δεν υποδηλοί αποδοχήν των γνωμών του συγγραφέως”

(Νόμος 5343/1932, αρθρ. 202, παράγρ. 2)

Στους γονείς μου
Δημήτριο και Ανδρονίκη
και στη σύζυγο μου Ράνια

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παγκοσμιοποίηση και η απελευθέρωση του διεθνούς εμπορίου τροφίμων έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη του κλάδου των τροφίμων και έχουν προσφέρει αξιόλογες ευκαιρίες και νέες δυνατότητες στους καταναλωτές. Αυτή η ραγδαία ανάπτυξη, ωστόσο, ελλοχεύει και κάποιους κινδύνους. Η μεταφορά των τροφίμων από το σημείο της παραγωγής, επεξεργασίας και τυποποίησης στο σημείο της διάθεσης των προϊόντων μπορεί να περιλαμβάνει εκατοντάδες ή και χιλιάδες χιλιόμετρα απόστασης, τη διακίνηση από ένα κράτος σε κάποιο άλλο ή ακόμα και σε άλλη ήπειρο. Υπάρχει επομένως μια αυξημένη πιθανότητα διασυνοριακής ή και διηπειρωτικής μεταφοράς μολυσματικών παραγόντων που σχετίζονται με τα τρόφιμα και συνεπώς έκθεσης των καταναλωτών σε νέους κινδύνους. Το γεγονός αυτό ενισχύεται και από το ότι μεγάλο μέρος των τροφίμων ζωικής προέλευσης, που καταναλώνονται στις αναπτυγμένες χώρες, παράγεται στις αναπτυσσόμενες χώρες. Στις χώρες αυτές η παρακολούθηση και η εποπτεία των συστημάτων για την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων δεν είναι τόσο αυστηρή με συνέπεια η πιθανότητα εκδήλωσης τροφιμογενών διαταραχών να μεγαλώνει (Cahill & Jouve, 2004). Παράλληλα, παράγοντες όπως ο σύγχρονος τρόπος ζωής, με τη συχνή κατανάλωση προμαγειρευμένων τροφίμων ή τη καθημερινή σίτιση σε χώρους μαζικής εστίασης, η εντατικοποίηση της παραγωγής στη βιομηχανία των τροφίμων, η εντατική γεωργία και κτηνοτροφία και τα συχνά ταξίδια εκθέτουν συχνά τους καταναλωτές σε ποικίλους μικροβιολογικούς κινδύνους.

Τα τελευταία χρόνια, έχει αυξηθεί σημαντικά η σημασία που δίνεται παγκοσμίως στα θέματα που αφορούν την ασφάλεια των τροφίμων λόγω της ιδιαίτερης και άμεσης επίδρασης που μπορεί να έχουν στη Δημόσια Υγεία. Η εμφάνιση παγκόσμιων διατροφικών κρίσεων όπως η σπογγιόμορφη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών, ο αφθώδης πυρετός, οι διοξίνες, η γρίπη των πουλερικών κατέστησε σαφές ότι η αντιμετώπιση αυτών των κρίσεων δεν

μπορεί να περιοριστεί στα πλαίσια των κρατών αλλά απαιτεί μια συλλογική αντιμετώπιση στο σύνολο της παγκόσμιας αγοράς των τροφίμων.

Οι παγκόσμιες αυτές διατροφικές κρίσεις σε συνδυασμό με τις τροφιμογενείς διαταραχές που οφείλονται ιδιαίτερα σε μικροβιακούς παράγοντες έχουν κλονίσει την εμπιστοσύνη του καταναλωτικού κοινού στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης και έχουν καταστήσει επιτακτική την ανάγκη για μια ακόμα καλύτερη διασφάλιση της υγιεινής και της ποιότητας τους. Η εμφάνιση τροφιμογενών διαταραχών έχει επανηλειμμένως σχετιστεί με την κατανάλωση προϊόντων ζωικής προέλευσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας έρευνας που πραγματοποιήθηκε σε 27 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EFSA, 2011), καταγράφηκαν συνολικά 5.550 ομαδικές τροφιμογενείς διαταραχές, προκαλώντας 48.964 κρούσματα σε ανθρώπους, 4.356 εισαγωγές σε νοσοκομεία και 46 θανάτους. Οι περισσότερες από τις τροφιμογενείς αυτές διαταραχές προκλήθηκαν από *Salmonella* spp., ιούς, βακτηριακές τοξίνες και άλλους παράγοντες. Οι ιοί που σχετίζονται με τα τρόφιμα περιλαμβάνουν τους καλυκοϊούς, τον ιό της ηπατίτιδας Α και άλλους αδιευκρίνιστους ιούς. Οι βακτηριακές τοξίνες αφορούν τοξίνες που παράγονται από βακτήρια του γένους *Bacillus*, *Clostridium* και *Staphylococcus*. Στους άλλους παράγοντες περιλαμβάνονται οι τοξίνες από μανιτάρια, οι θαλάσσιες βιοτοξίνες, η ισταμίνη, οι μυκοτοξίνες, τα παράσιτα *Trichinella* κυρίως αλλά και *Anisakis*. Τέλος, άλλοι μικροβιακοί παράγοντες εκτός των *Salmonella* spp. που σχετίζονται με την πρόκληση τροφιμογενών λοιμώξεων είναι τα είδη του γένους των βακτηρίων *Brucella*, *Listeria*, *Shigella*, *Yersinia* και *Vibrio*. Οι πιο σημαντικές πηγές μόλυνσης ήταν τα αυγά και τα προϊόντα τους, τα πουλερικά, τα γεύματα σε μπουφέ, το χοιρινό κρέας και τα προϊόντα του.

Όσον αφορά το αντικείμενο της παρούσας διατριβής, οι έρευνες που σχετίζονται με την αντιμετώπιση της μόλυνσης του κρέατος των ορνιθίων κρεοπαραγωγής από παθογόνα βακτήρια όπως οι σαλμονέλες και οι λιστέριες είναι πολύ περιορισμένες μέχρι σήμερα στη Ελλάδα. Σε διεθνή κλίμακα έχουν γίνει αρκετές ερευνητικές προσπάθειες περιορισμού της μόλυνσης με τη χρήση διαφόρων χημικών ουσιών (ανόργανα και οργανικά οξέα, κ.ά.) στη

γραμμή σφαγής (έκπλυση, καταιωνισμός). Ωστόσο, ελάχιστες έρευνες έχουν αναφερθεί τόσο στη χώρα μας όσο και διεθνώς στη χρησιμοποίηση προστατευτικών καλλιεργειών ή «φυσικών» προστατευτικών ουσιών για την αντιμετώπιση των *Salmonella* spp και *Listeria* spp. σε κρέας ορνιθίων και των προϊόντων του.

Η παρούσα έρευνα επικεντρώθηκε στην προστασία του κρέατος των ορνιθίων κρεοπαραγωγής από παθογόνους μικροοργανισμούς (*Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes*) με τη χρησιμοποίηση προστατευτικών καλλιεργειών οξυγαλακτικών βακτηρίων που προέρχονται από την αυτόχθονη χλωρίδα του. Ο τελικός στόχος ήταν η διερεύνηση μεθόδων για την παραγωγή κρέατος ορνιθίων και των προϊόντων τους που θα είναι ασφαλή για την υγεία του καταναλωτή.

Το πειραματικό μέρος της έρευνας αυτής περιλαμβάνει έξι φάσεις:

1^η φάση: Απομόνωση, ταυτοποίηση και διερεύνηση της αντιμικροβιακής ευαισθησίας στελεχών *Salmonella* spp. από τα σφάγια των ορνιθίων και από το περιβάλλον του πτηνοσφαγείου.

2^η φάση: Απομόνωση, ταυτοποίηση και διερεύνηση της αντιμικροβιακής ευαισθησίας στελεχών *Listeria monocytogenes* από τα σφάγια των ορνιθίων και από το περιβάλλον του πτηνοσφαγείου.

3^η φάση: Απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων από τα σφάγια των ορνιθίων και αξιολόγησή τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως βιοπροστατευτικές καλλιέργειες.

4^η φάση: Ενοφθαλμισμός των παθογόνων *Salmonella* spp και *Listeria monocytogenes* και των αποτελεσματικότερων οξυγαλακτικών βακτηρίων σε θρεπτικούς ζωμούς, μελέτη της εξέλιξης του πληθυσμού των παθογόνων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων και στη συνέχεια αξιολόγηση της βιοπροστατευτικής τους ικανότητας με στόχο την εύρεση της αποτελεσματικότερης οξυγαλακτικής καλλιέργειας.

5^η φάση: Τεχνητή μόλυνση του δέρματος των σφαγίων των ορνιθίων με *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes* και ταυτόχρονα ενοφθαλμισμός

με την αποτελεσματικότερη βιοπροστατευτική οξυγαλακτική καλλιέργεια και στη συνέχεια, μελέτη της εξέλιξης του πληθυσμού των παθογόνων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

6^η φάση: Τεχνητή μόλυνση τμημάτων (φιλέτο) των σφαγίων των ορνιθίων με *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes* (στελέχη που απομονώθηκαν από τα σφάγια) και ταυτόχρονα ενοφθαλμισμός με την αποτελεσματικότερη βιοπροστατευτική καλλιέργεια και μελέτη της εξέλιξης του πληθυσμού των παθογόνων βακτηρίων.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε κυρίως στο Εργαστήριο Υγιεινής Προϊόντων Ζωικής Προέλευσης και δευτερευόντως στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Προϊόντων Ζωικής Προέλευσης του Τομέα Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. Η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής δεν θα ήταν ίσως εφικτή χωρίς τη βοήθεια κάποιων ανθρώπων τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον επιβλέποντα καθηγητή Δρ. Παύλο Κοϊΐδη, για την δυνατότητα που μου παρείχε να εκπονήσω την παρούσα διατριβή, τις καίριες συμβουλές και παρατηρήσεις του καθ'όλη τη διάρκεια της έρευνας και της συγγραφής της.

Τον καθηγητή Δρ. Ιωάννη Αμβροσιάδη, για τις πολύτιμες συμβουλές και επισημάνσεις του κατά την εκπόνηση και συγγραφή της διατριβής.

Τον αν. καθηγητή Δρ. Νικόλαο Σούλτο, για τον καθοριστικό του ρόλο για την ολοκλήρωση της διατριβής ως δεύτερου επιβλέποντα καθηγητή. Η επιστημονική του καθοδήγηση και οι εποικοδομητικές παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια των πειραματισμών και της συγγραφής αναβάθμισαν σημαντικά τη παρούσα διατριβή.

Την αν. καθηγήτρια Δρ. Ελένη Ιωσηφίδου, την αν. καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. Δρ. Άννα Παπά, το λέκτορα Δρ. Χρυσόστομο Δόβα και την επ. καθηγήτρια Δρ. Αικατερίνη Παπαβέργου για την πολύτιμη

βοήθεια τους κατά της διάρκειας της έρευνας και τις καίριες παρατηρήσεις και διορθώσεις τους κατά τη συγγραφή της διατριβής.

Τον καθηγητή Δρ. Χρήστο Μπάτζιο, για την πολύτιμη και καθοριστική του βοήθεια για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Το λέκτορα Δρ. Δάνο Σεργκελίδη, για την ηθική του συμπαράσταση και τις πολύτιμες και ουσιαστικές συμβουλές του.

Τα υπόλοιπα μέλη Δ.Ε.Π., και το εργαστηριακό προσωπικό του Τομέα Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης για το ειλικρινές ενδιαφέρον τους και τη βοήθεια τους όποτε τους ζητήθηκε.

Τους γονείς μου Δημήτριο και Ανδρονίκη, για την ηθική και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Τη σύζυγο μου Ράνια, για τη πολύπλευρη στήριξη, συμπαράσταση και υπομονή της όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, την αδερφή μου Ζωή, τα αγαπημένα μου πρόσωπα και τους φίλους μου, για το ενδιαφέρον και τη συμπαράσταση τους.

BIBLIOΓΡΑΦΙΑ

Cahill, S.M. and Jouve, J.R. 2004. Microbiological Risk Assessment in Developing Countries. *Journal of Food Protection* 67 (9), 2016-2023.

EFSA 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *The EFSA Journal* 9(3), 1-378.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	6
Κεφάλαιο 1^ο: Γενική Εισαγωγή.....	10
1.1 Το ορνίθιο κρέας στη διατροφή του ανθρώπου.....	11
1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μόλυνση του κρέατος των πουλερικών	12
1.2.1 Παράγοντες μόλυνσης των ζωντανών πουλερικών	12
1.2.2 Παράγοντες μόλυνσης του σφαγίου στα διάφορα στάδια προετοιμασίας του.....	13
1.2.3 Παράγοντες μόλυνσης του κρέατος κατά τη επεξεργασία, συσκευασία, διακίνηση του και προετοιμασία του γεύματος.....	15
1.3 Παθογόνοι μικροοργανισμοί	17
1.3.1 <i>Salmonella</i> spp.....	18
1.3.2 <i>Listeria</i> spp. και <i>Listeria monocytogenes</i>	23
1.4 Ασφάλεια – επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης του κρέατος των πουλερικών.....	25
1.4.1 Προστατευτικές οξυγαλακτικές καλλιέργειες	26
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	39
Κεφάλαιο 2^ο: Διερεύνηση της παρουσίας και της αντιμικροβιακής αντοχής στελεχών <i>Salmonella</i> spp. που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων στη Β. Ελλάδα.....	52
2.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	53
2.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	54
2.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	56
2.3.1 Δειγματοληψία	56
2.3.2 Απομόνωση των <i>Salmonella</i> spp.	57

2.3.3 Ορολογική τυποποίηση των <i>Salmonella</i> spp.....	58
2.3.4 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των <i>Salmonella</i> spp.....	58
2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
2.4.1 Παρουσία των <i>Salmonella</i> spp. στα σφάγια ορνιθίων και στο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων	59
2.4.2 Κατανομή των οροτύπων <i>Salmonella</i> spp. που απομονώθηκαν από τα σφάγια των ορνιθίων.....	60
2.4.3 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των <i>Salmonella</i> spp. που απομονώθηκαν από τα σφάγια των ορνιθίων και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων	61
2.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
2.5.1 Παρουσία των <i>Salmonella</i> spp. στα σφάγια ορνιθίων και στο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων	64
2.5.2 Κατανομή των οροτύπων <i>Salmonella</i> spp. στα σφάγια ορνιθίων ...	67
2.5.3 Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των <i>Salmonella</i> spp. που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων	69
2.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74
Κεφάλαιο 3^ο: Διερεύνηση της παρουσίας και της αντιμικροβιακής αντοχής στελεχών <i>Listeria monocytogenes</i> που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων στη Β. Ελλάδα	83
3.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	84
3.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	85
3.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	88
3.3.1 Δειγματοληψία	88
3.3.2 Απομόνωση των <i>Listeria</i> spp. και <i>L. monocytogenes</i>	89
3.3.3 Ταυτοποίηση και Γενετική Υποτυποποίηση της <i>L. monocytogenes</i>	90
3.3.4 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες της <i>L. monocytogenes</i>	90
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	91

3.4.1 Παρουσία των <i>Listeria</i> spp. και της <i>L. monocytogenes</i> στα σφάγια ορνιθίων	91
3.4.2 Παρουσία των <i>Listeria</i> spp. και της <i>L. monocytogenes</i> στο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων	92
3.4.3 Γενετική υποτυποποίηση των στελεχών <i>L. monocytogenes</i>	93
3.4.4 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των στελεχών <i>L. monocytogenes</i>	94
3.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	96
3.5.1 Παρουσία των <i>Listeria</i> spp. και <i>L. monocytogenes</i> στα σφάγια και στο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων	96
3.5.2 Γενετική υποτυποποίηση των στελεχών <i>L. monocytogenes</i>	98
3.5.3 Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των στελεχών <i>L. monocytogenes</i> που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων	100
3.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	103
Κεφάλαιο 4^ο: Απομόνωση και ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων από σφάγια ορνιθίων με ανασταλτική δράση εναντίον των <i>Salmonella</i> spp. και της <i>Listeria monocytogenes</i>.....	110
4.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	111
4.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	111
4.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	114
4.3.1 Δειγματοληψία	114
4.3.2 Απομόνωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων	115
4.3.3 Μέθοδος Αναστολής Διπλής Επίστρωσης.....	115
4.3.4 Επιλογή των ψυχρότροφων οξυγαλακτικών βακτηρίων	117
4.3.5 Βιοχημική ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων	118
4.3.6 Μοριακή ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων	118
4.3.7 Παραγωγή των βιογενών αμινών τυραμίνης και ισταμίνης	121
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	122

4.4.1 Απομόνωση των δυνητικά βιοπροστατευτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων	122
4.4.2 Βιοχημική ταυτοποίηση	126
4.4.3 Μοριακή ταυτοποίηση	127
4.4.4 Παραγωγή των βιογενών αμινών τυραμίνης και ισταμίνης	129
4.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	129
4.5.1 Απομόνωση των δυνητικά βιοπροστατευτικών βακτηρίων από τα σφάγια ορνιθίων	129
4.5.2 Βιοχημική ταυτοποίηση	130
4.5.3 Μοριακή ταυτοποίηση	131
4.5.4 Παραγωγή των βιογενών αμινών τυραμίνης και ισταμίνης	132
4.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	134
Κεφάλαιο 5^ο: Αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων εναντίον των <i>Salmonella</i> spp. και <i>Listeria monocytogenes</i> που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων	140
5.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	141
5.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	142
5.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	144
5.3.1 Προετοιμασία των καλλιεργειών των παθογόνων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων	144
5.3.2 Έλεγχος της ανταγωνιστικής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ζυμό BHI	145
5.3.3 Έλεγχος της ανταγωνιστικής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο δέρμα των ορνιθίων	145
5.3.4 Έλεγχος της ανταγωνιστικής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο ορνίθειο κρέας	146
5.3.5 Μικροβιολογικές εξετάσεις.....	147
5.3.6 Οργανοληπτικός έλεγχος.....	147
5.3.7 Στατιστική επεξεργασία	147

5.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	149
5.4.1 Ανταγωνιστική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ζυμό ΒΗΙ	149
5.4.2 Ανταγωνιστική δράση του <i>Lactobacillus salivarius</i> στο ορνίθιο δέρμα	153
5.4.3 Ανταγωνιστική δράση του <i>Lactobacillus salivarius</i> στο ορνίθιο κρέας	157
5.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	161
5.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	165
Κεφάλαιο 6°: Γενικά συμπεράσματα.....	169
Κεφάλαιο 7°: Προτεινόμενη συμπληρωματική έρευνα.....	173
Κεφάλαιο 8°: Δημοσιεύσεις.....	175
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	179

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ερευνητική αυτή εργασία είχε ως κύριο στόχο την προστασία του κρέατος των ορνιθίων από παθογόνους μικροοργανισμούς (*Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes*) με τη χρησιμοποίηση προστατευτικών καλλιεργείων οξυγαλακτικών βακτηρίων που προέρχονται από την αυτόχθονη χλωρίδα τους.

Το πειραματικό μέρος της έρευνας περιλαμβάνει έξι φάσεις:

Στην **1^η φάση** έγινε απομόνωση, ταυτοποίηση και έλεγχος της αντιμικροβιακής ευαισθησίας στελεχών *Salmonella* spp. από τα σφάγια των ορνιθίων και από το περιβάλλον τεσσάρων πτηνοσφαγείων της Β. Ελλάδας. Εξετάστηκαν συνολικά 150 δείγματα δέρματος τραχήλου που προέρχονταν από 450 σφάγια ορνιθίων και 40 δείγματα επιφανειών, προερχόμενα από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων. Πενήντα εννέα στελέχη *Salmonella* spp. (ένα στέλεχος από κάθε θετικό δείγμα συμπεριλαμβάνοντας και τα δείγματα από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων) ελέγχθηκαν επίσης για την ευαισθησία τους σε είκοσι αντιμικροβιακούς παράγοντες με τη μέθοδο της διάχυσης των δίσκων.

Στη **2^η φάση** έγινε απομόνωση, ταυτοποίηση και έλεγχος της αντιμικροβιακής ευαισθησίας στελεχών *Listeria* spp. και *Listeria monocytogenes* από τα σφάγια των ορνιθίων και από το περιβάλλον των ίδιων ως άνω πτηνοσφαγείων. Εξετάστηκαν συνολικά 100 δείγματα δέρματος τραχήλου προερχόμενα από 300 σφάγια ορνιθίων, και 40 δείγματα επιφανειών, προερχόμενα από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων. Ακολούθησε ταυτοποίηση με τη μέθοδο multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction), γενετική τυποποίηση με τη μέθοδο RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA analysis) και έλεγχος της ευαισθησίας σε 20 αντιμικροβιακούς παράγοντες 55 επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes* που είχαν απομονωθεί τόσο από τα σφάγια των ορνιθίων όσο και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων.

Στην **3^η φάση** έγινε απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων από τα σφάγια των ορνιθίων και αξιολόγησή τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως βιοπροστατευτικές καλλιέργειες. Για την αναζήτηση οξυγαλακτικών βακτηρίων εξετάστηκαν συνολικά 100 δείγματα ορνιθίων. Η απομόνωση τους έγινε λαμβάνοντας υπόψη τον ψυχρότροφο χαρακτήρα και την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι των *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes*, που απομονώθηκαν επίσης από τα σφάγια των ορνιθίων. Απομονώθηκαν αρχικά 92 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία ταυτοποιήθηκαν και εξετάστηκαν περαιτέρω για τις ψυχρότροφες ιδιότητες τους. Επιπλέον ελέγχθηκε η ασφάλεια της χρήσης των επτά αποτελεσματικότερων οξυγαλακτικών βακτηρίων όσον αφορά την παραγωγή των βιογενών αμινών τυραμίνης και ισταμίνης.

Στην **4^η φάση** έγινε ενοφθαλμισμός των παθογόνων *Salmonella* spp και *Listeria monocytogenes* και των αποτελεσματικότερων οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ζωμό BHI (Brain Heart Infusion), μελέτη της εξέλιξης του πληθυσμού των παθογόνων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων και στη συνέχεια αξιολόγηση της βιοπροστατευτικής τους ικανότητας με στόχο την εύρεση της αποτελεσματικότερης οξυγαλακτικής καλλιέργειας.

Στην **5^η φάση** έγινε τεχνητή μόλυνση του δέρματος των σφαγίων των πουλερικών με *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes* και ταυτόχρονα ενοφθαλμισμός με την αποτελεσματικότερη βιοπροστατευτική οξυγαλακτική καλλιέργεια και στη συνέχεια, μελέτη της εξέλιξης του πληθυσμού των παθογόνων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Στην 6^η φάση έγινε τεχνητή μόλυνση τμημάτων (φιλέτο) των σφαγίων των πουλερικών με *Salmonella* spp. και *Listeria* spp. (στελέχη που απομονώθηκαν από τα σφάγια) και ταυτόχρονα ενοφθαλμισμός με την αποτελεσματικότερη βιοπροστατευτική καλλιέργεια και μελέτη της εξέλιξης του πληθυσμού των παθογόνων βακτηρίων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

Salmonella spp. βρέθηκαν σε 56 (37%) από τα 150 ορνίθια δείγματα που εξετάστηκαν. Όσον αφορά τη μόλυνση του περιβάλλοντος των πτηνοσφαγείων, τρία δείγματα επιφανειών από τα 40 που εξετάστηκαν συνολικά και στα τέσσερα πτηνοσφαγεία, βρέθηκαν μολυσμένα με *Salmonella* spp., τα οποία προέρχονταν από ένα μόνο πτηνοσφαγείο. Συνολικά απομονώθηκαν 142 στελέχη τα οποία ανήκαν σε έξι διαφορετικούς ορότυπους. Ο ορότυπος που απομονώθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα ήταν ο *S. Blockley* (73,2%), και ακολουθούσαν κατά φθίνουσα σειρά οι *S. Paratyphi B* (16,9%), *S. Bredeney* (6,3%), *S. Neftenbach* (1,4%), *S. Hadar* (1,4%) και *S. Thompson* (0,7%). Όλα τα στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά σε 4 αντιβιοτικά (πενικιλίνη, ερυθρομυκίνη, βανκομυκίνη και κλινδαμυκίνη). Υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν επίσης στην τετρακυκλίνη, στην οξυτετρακυκλίνη, στο οξολινικό οξύ, στο ναλιδιζικό οξύ, στην στρεπτομυκίνη, στη χλωραμφαινικόλη, στη νεομυκίνη και στην καναμυκίνη.

Listeria spp. και *Listeria monocytogenes* απομονώθηκαν σε ποσοστό 99% και 38%, αντιστοίχως, του συνόλου των εξετασθέντων δειγμάτων σφαγίων ορνιθίων. Όσον αφορά τη μόλυνση του περιβάλλοντος των πτηνοσφαγείων, όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν βρέθηκαν μολυσμένα με *Listeria* spp. ενώ *L. monocytogenes* απομονώθηκε από το περιβάλλον ενός μόνο πτηνοσφαγείου σε ποσοστό 80%. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο RAPD, τα στελέχη της *L. monocytogenes* κατηγοριοποιήθηκαν σε 2 κλάδους και 10 υποκλάδους. Όλα τα στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά σε δύο αντιμικροβιακούς παράγοντες (ναλιδιζικό και οξολινικό οξύ), ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών βρέθηκαν να είναι ευαίσθητα στους υπόλοιπους.

Από τα 92 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν αρχικά, επιλέχθηκαν 50 τα οποία ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση τυποποιημένων βιοχημικών διαδικασιών σε μικρογραφία (API 50 CH Micro-kits) και στη συνέχεια με μοριακή μέθοδο με αλληλούχιση της 16s-23s διαχωριστικής των γονιδίων περιοχής. Με βάση τη μοριακή μέθοδο ταυτοποιήθηκαν πέντε διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων: *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paralimentarius* και *Pediococcus acidilactici*.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ανασταλτική δράση των 7 στελεχών (5 είδη) των οξυγαλακτικών βακτηρίων εναντίον των *Salmonella* spp και *Listeria monocytogenes* σε ζωμό BHI. Από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψαν τα εξής: α) Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρέμεινε σταθερός κατά τη διάρκεια των 5 ημερών του πειράματος στη θερμοκρασία των 7°C ανεξάρτητα από την παρουσία των παθογόνων. β) Παρατηρήθηκε μια στατιστικώς σημαντική μείωση ($P \leq 0,05$) της αύξησης του πληθυσμού των *Salmonella* spp. και της *Listeria monocytogenes* που την 5^η μέρα κυμάνθηκε από 0,41 έως 1,12 log cfu/ml και από 0,77 έως 1,48 log cfu/ml, αντιστοίχως. γ) Από τα 7 στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων ο *Lactobacillus salivarius* παρουσίασε την εντονότερη ανασταλτική δράση τόσο έναντι των *Salmonella* spp. όσο και της *Listeria monocytogenes*.

Ακολούθησε η αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης του *Lactobacillus salivarius* έναντι των ίδιων παθογόνων (*Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes*) στο δέρμα και στο κρέας των ορνιθίων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε τα εξής: α) Στο δέρμα των ορνιθίων ο *Lactobacillus salivarius* προκάλεσε μείωση της αύξησης του πληθυσμού των *Salmonella* spp. και της *Listeria monocytogenes* κατά 0,54 log cfu/cm² και 0,71 log cfu/cm², αντιστοίχως, την 6^η μέρα του πειραματισμού. β) Στο κρέας των ορνιθίων η μείωση της αύξησης των παθογόνων ήταν ελαφρώς μικρότερη, ενώ οι διαφορές μεταξύ των πειραματισμών στο δέρμα και στο κρέας δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ($P > 0,05$).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν ένα σημαντικό ποσοστό μόλυνσης των σφαγίων ορνιθίων με *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes*. Παρατηρήθηκε επίσης ένα υψηλό ποσοστό παρουσίας ανθεκτικών στελεχών *Salmonella* spp., ενώ τα στελέχη *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν βρέθηκαν να είναι ευαίσθητα στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, που χρησιμοποιούνται συχνότερα για τη θεραπεία της λιστερίωσης σε ανθρώπους. Παράλληλα, απομονώθηκε ένας μεγάλος αριθμός ψυχρότροφων οξυγαλακτικών βακτηρίων από σφάγια ορνιθίων κρεοπαραγωγής που παρουσίαζαν ανασταλτική δράση έναντι

στελεχών *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes*. Η αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των 7 αποτελεσματικότερων στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ζυμό BHI, και του αποτελεσματικότερου από αυτά στελέχους στο δέρμα και στο κρέας ορνιθίων έδειξε ότι το είδος *Lactobacillus salivarius* είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως προστατευτική καλλιέργεια, σε συνδυασμό με άλλα μικροβιακά εμπόδια, για τη βελτίωση της ασφάλειας και την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης του ορνιθείου κρέατος.

ABSTRACT

This study was focused on the protection of chicken meat from pathogenic microorganisms (*Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes*) by using bioprotective cultures of lactic acid bacteria originating from their indigenous microflora.

The study was divided into 6 main stages:

Stage 1: The prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from chicken carcasses and the environment of 4 slaughterhouses of Northern Greece was investigated. A total of 150 broiler neck skin samples taken from 450 poultry carcasses and 40 environmental samples were examined for *Salmonella* spp. and the results were reported as presence or absence of *Salmonella* spp. Fifty nine isolates of *Salmonella* (one strain from each positive poultry and environmental sample) were tested for susceptibility to 20 antimicrobial agents using the disk diffusion method.

Stage 2: The prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* recovered from chicken carcasses and the environment of the same 4 slaughterhouses of Northern Greece was investigated. A total of 100 neck-skin poultry samples (300 carcasses) were examined for *Listeria* spp. Forty samples were also taken from the environment of the slaughterhouses. Identification of *L. monocytogenes* was carried out by multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction) and fingerprinting of the isolates by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis. Fifty five isolates of *L. monocytogenes*, isolated from chicken carcasses and from the environment of the slaughterhouses, were also tested for susceptibility to 20 antimicrobial agents using the disk diffusion method.

Stage 3: Lactic acid bacteria originating from chicken carcasses were isolated, identified and evaluated for their inhibitory activity against strains of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. A total of 100 broiler samples (300 carcasses) were examined for presence of lactic acid bacteria. The

isolation of lactic acid bacteria was performed taking into account their antimicrobial action against *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. 92 isolates of lactic acid bacteria that showed antimicrobial effect against these pathogens were further analyzed to examine their LAB and psychrotrophic characteristics. Additionally, their safety in relation to the production of the biogenic amines, tyramine and histamine was confirmed

Stage 4: Cells of lactic acid bacteria (LAB) isolated from the neck skin of poultry carcasses were cultured in BHI broth along with cells of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in order to determine their antagonistic activity against the pathogens during storage at 7°C.

Stage 5: The LAB strain (*Lactobacillus salivarius*) with the best inhibitory activity against both *Salmonella* and *L. monocytogenes* observed in broths, was chosen to examine its action against the same pathogens on chicken skin.

Stage 6: The antimicrobial action of the LAB strain (*Lactobacillus salivarius*) against the same pathogens was also examined on chicken meat.

Salmonella spp. were present in 56 (37%) of the poultry samples tested. Three environmental samples were also found contaminated with *Salmonella* spp. and were all coming from the same slaughterhouse. A total of 142 isolates belonging to 6 serovars were detected. The most common serotype identified was *S. Blockley* (73.2%), followed by *S. Paratyphi B* (16.9%), *S. Bredeney* (6.3%), *S. Neftenbach* (1.4%), *S. Hadar* (1.4%) and *S. Thompson* (0.7%). All isolates were resistant to 4 antimicrobials (Penicillin, Erythromycin, Vancomycin and Clindamycin) and the mass majority of them to another 8 antimicrobials (Tetracycline, Oxytetracycline, Oxolinic acid, Nalidixic acid, Streptomycin, Chloramphenicol, Neomycin and Kanamycin).

Listeria spp. were present in 99 of the poultry samples tested (99%) and 38 yielded *L. monocytogenes* (38%). *L. monocytogenes* was also isolated from the environment of a certain slaughterhouse in a percentage of 80% while the other slaughterhouses were found to be contaminated only with

Listeria spp. By using the RAPD method, all strains of *Listeria monocytogenes* were categorized into two major clades and 10 subclades. All isolates were found to be resistant to nalidixic acid and oxolinic acid, whereas the majority of them was susceptible to all other antimicrobials.

Fifty isolates of lactic acid bacteria were selected from the initial 92 strains and identified at first by using ready standard biochemical processes in miniature (Micro-kits API CH 50) and then by sequencing of the 16s – 23s rRna gene boundary region (Intergenic Spacer Region, ISR). After their molecular identification, these isolates were found to belong to 5 different species of lactic acid bacteria: *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Pediococcus acidilactici*, and *Lactobacillus paralimentarius*.

The antimicrobial activity of 7 selected strains of lactic acid bacteria (5 species) against *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* was then examined in BHI broth. All LAB isolates survived well in the broths at the temperature of 7°C and their population levels remained constant throughout the 5 days storage with or without the presence of the pathogens. There was a statistically significant reduction ($P \leq 0.05$) in *Salmonella* population at the 5th day that varied from 0.41 to 1.12 log cfu/ml. The protective effect of LAB isolates was also statistically significant ($P \leq 0.05$) for *Listeria monocytogenes* where the reduction of its population at the 5th day varied from 0.77 to 1.48 log cfu/ml.

On chicken skin, the growth reduction at the 6th day caused by *L. salivarius* was lower and did not exceed the 0.54 log cfu/cm² for *Salmonella* spp. and 0.71 log cfu/cm² for *Listeria monocytogenes*. The reduction on chicken meat was slightly lower for both pathogens, while differences among chicken skin and meat were not found statistically significant ($P > 0.05$).

In conclusion, the results of this study demonstrate a high prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in chicken carcasses. A large percentage of antimicrobial resistant strains of *Salmonella* spp. were identified, whereas all *Listeria monocytogenes* isolates were found

sensitive to antimicrobials most commonly used to treat human listeriosis. A selection and evaluation of numerous lactic acid bacteria isolates from poultry carcasses that presented sufficient inhibitory activity against *Salmonella* and *Listeria* was carried out. The antagonistic activity of the 7 selected lactic acid bacteria strains against *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in BHI broth and mainly of *L. salivarius* on chicken skin and meat was evaluated. The results of these experiments suggested that *L. salivarius* has a potential to be used as protective culture, in combination with other microbial hurdles, to improve the safety and extend the shelf life of chicken meat.

Κεφάλαιο 1^ο

Γενική Εισαγωγή

1.1 Το ορνίθιο κρέας στη διατροφή του ανθρώπου

Η κατανάλωση του ορνίθιου κρέατος και των προϊόντων του κατέχει την πρώτη θέση μεταξύ των διαφόρων ειδών κρέατος στην προτίμηση των καταναλωτών, γεγονός που οφείλεται στην υψηλή διαιτητική του αξία, στην ικανότητα προσαρμογής του στις απαιτήσεις του καταναλωτή και στη χαμηλή του τιμή. Το ορνίθιο κρέας αναφέρεται και ως λευκό κρέας, και συχνά εντάσσεται σε διατροφικά προγράμματα απώλειας βάρους λόγω της χαμηλότερης περιεκτικότητας σε ζωικό, και άρα κορεσμένο κυρίως, λίπος και της υψηλότερης περιεκτικότητας σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σε σχέση με τα άλλα είδη κρέατος. Αποτελεί παράλληλα και πηγή πολύτιμης πρωτεΐνης, υψηλής βιολογικής αξίας. Συνεπώς, το ορνίθιο κρέας θα πρέπει να θεωρείται ως ένα είδος τροφής που είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και παράλληλα είναι κατάλληλο για κατανάλωση από άτομα που ακολουθούν μια δίαιτα χαμηλή σε λιπαρά (Mead, 2005).

Στην εμπορική αξία του ορνίθιου κρέατος συμβάλλει και η εξαιρετική ικανότητα προσαρμογής του στις απαιτήσεις του καταναλωτή. Το ορνίθιο κρέας μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τον καταναλωτή ως φιλέτο, φτερούγες, κοτομπουκιές (chicken nuggets), μπούτια, σουβλάκι, σουβλάκι με μπέικον, σνίτσελ, ρολό, ρολό γεμιστό με κασέρι και ζαμπόν, μπιφτέκι, σουτζουκάκι και πολλά άλλα. Η ποικιλία αυτή δίνει την δυνατότητα στον καταναλωτή να ικανοποιεί την ανάγκη του για εναλλαγή των γεύσεων και αποτρέπει την εμφάνιση ενός αισθήματος «κορεσμού» απέναντι στο κοτόπουλο.

Πέρα από τα αδιαμφισβήτητα πλεονεκτήματα του ορνίθιου κρέατος ως τρόφιμο, είναι γνωστό ότι τα σφάγια των ορνιθίων εξαιτίας του τρόπου σφαγής τους είναι συχνά μολυσμένα με παθογόνους μικροοργανισμούς όπως οι *Salmonella* spp., η *Listeria monocytogenes*, τα *Campylobacter* spp., τα *Clostridium* spp. και ο *Staphylococcus aureus*. Σε μικρότερη συχνότητα απαντώνται η *Escherichia coli*, ο *Bacillus cereus*, η *Yersinia enterocolitica* και ακόμη σπανιότερα το *Clostridium botulinum* (Cox και συν., 2005; Mead, 1989). Κατά συνέπεια, το ορνίθιο κρέας και τα προϊόντα του είναι δυνατό να

προκαλέσουν την εμφάνιση τροφιμογενών διαταραχών στους καταναλωτές, σε περίπτωση που δεν έχουν υποστεί επαρκή θερμική επεξεργασία.

1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μόλυνση του κρέατος των πουλερικών

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μόλυνση του κρέατος των πουλερικών χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αναφέρεται σε παράγοντες πριν από τη σφαγή, η δεύτερη σε εκείνους που παρεμβαίνουν κατά τη προετοιμασία του σφαγίου και η τρίτη σε εκείνους που παρεμβαίνουν κατά την επεξεργασία, τη διακίνηση, τη συντήρηση του κρέατος και την προετοιμασία του γεύματος.

1.2.1 Παράγοντες μόλυνσης των ζωντανών πουλερικών

Στο πτηνοτροφείο

Τα ζωντανά πουλερικά φιλοξενούν διάφορους παθογόνους ή μη μικροοργανισμούς επάνω στο δέρμα, στο πτέρωμα και στο εσωτερικό του σώματός τους και ιδιαίτερα στο έντερο. Παράγοντες που συμβάλλουν στη μόλυνση των ζωντανών πουλερικών είναι η μολυσμένη τροφή, η μόλυνση διαμέσου του αυγού (κάθετη μόλυνση), οι κακές συνθήκες διαβίωσης στην εκτροφή (συνωστισμός, κακός αερισμός, υγρασία) και διάφοροι άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως τα ποντίκια, τα άγρια πουλιά, το νερό, ο άνθρωπος κτλ. (Bryan και Doyle, 1995; Byrd και McKee, 2005; Grau, 1986; N.A.C.M.C.F., 1995; Tinker και συν., 2005; WHO, 1989).

Στη μεταφορά

Μελέτες έδειξαν ότι το "στρες" της μεταφοράς αυξάνει το ποσοστό μόλυνσης στα πουλερικά. Επίσης ο συνωστισμός μέσα στα κλουβιά μεταφοράς επιδεινώνει το πρόβλημα της μόλυνσης (Bolder, 1998; Byrd και McKee, 2005; Mead, 1989; Mulder, 1996; Tinker και συν., 2005).

Κατά τη διαδικασία αγκίστρωσης

Τέλος, κατά τη διαδικασία αγκίστρωσης των ζωντανών πουλερικών στην αλυσίδα μεταφοράς που τα οδηγεί στο σημείο ηλεκτρονάρκωσής τους, συνήθως δημιουργείται σκόνη από το κτύπημα των πτερύγων τους, η οποία μολύνει το περιβάλλον με παθογόνους μικροοργανισμούς (Allen και συν., 2007; Bolder, 2007; Mead, 1989).

1.2.2 Παράγοντες μόλυνσης του σφαγίου στα διάφορα στάδια προετοιμασίας του

Μόλυνση στη δεξαμενή ζεματίσματος

Η πρώτη σοβαρή μόλυνση των πουλερικών μετά τη θανάτωσή τους συμβαίνει στη δεξαμενή ζεματίσματος. Το νερό της δεξαμενής συνήθως μολύνεται με μικροοργανισμούς που μεταφέρονται με το πτέρωμα, τα κόπρανα, τα άκρα και το δέρμα των πουλερικών (Byrd και McKee, 2005; Mead, 1989). Οι διάφοροι μικροοργανισμοί, όταν βρεθούν στο νερό της δεξαμενής είτε θανατώνονται εξαιτίας της θερμοκρασίας του νερού (52-58°C), είτε απάγονται με την υπερχέλιση, είτε τέλος επιβιώνουν και μεταφέρονται σε άλλα σφάγια (Bryan και Doyle, 1995; Byrd και McKee, 2005; Bolder, 1998).

Γενικά, τα μεσόφιλα βακτήρια θεωρούνται περισσότερο θερμοανθεκτικά από τα ψυχρότροφα. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί και το μικρό αριθμό ψυχρότροφων βακτηρίων σε σφάγια πουλερικών που εξετάστηκαν αμέσως μετά την αποπτίλωσή τους (Genigeorgis και συν. 1990; Thomas και McMeekin, 1980).

Μόλυνση κατά τη διάρκεια της αποπτίλωσης

Στο στάδιο της αποπτίλωσης η μόλυνση γίνεται εντονότερη επειδή το περιβάλλον είναι θερμό και υγρό. Τα μολυσμένα ελαστικά ριπίδια της αποπτιλωτικής μηχανής δύσκολα καθαρίζονται και οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν, πολλαπλασιάζονται μέσα στην οργανική ύλη, σχηματίζουν βιολογικά υμένια στις διάφορες μεταλλικές επιφάνειες της μηχανής και έτσι δημιουργούν τις προϋποθέσεις της μόλυνσης των σφαγίων της επόμενης ημέρας (Bolder, 2007; Κοϊδης, 2003). Επίσης, τα ριπίδια καθώς κινούνται πιέζουν και ωθούν τους μικροοργανισμούς μέσα στις ρωγμές και στις οπές του δέρματος που δημιουργούνται κατά την αποπτίλωση, με αποτέλεσμα να καθίσταται πολύ δύσκολη η απομάκρυνσή τους κατά τη διαδικασία έκπλυσης των σφαγίων. (Bolder, 2007; Bryan και Doyle, 1995; Genigeorgis, 1995; Lillard, 1989; Varnam και Sutberland, 1995).

Μόλυνση κατά τη διάρκεια του εκσπλαχνισμού

Το στάδιο του εκσπλαχνισμού είναι επίσης ένα κρίσιμο στάδιο από πλευράς υγιεινής, γιατί η αφαίρεση των σπλάχνων απαιτεί λεπτούς χειρισμούς και εξαιτίας τεχνικών σφαλμάτων μπορεί να μολυνθούν τα σφάγια και τα εργαλεία από εντερικό περιεχόμενο (Κοϊδης, 2003). Ο μηχανικός εκσπλαχνισμός με τη βοήθεια εφαρμογής κενού μπορεί να περιορίσει σημαντικά τη μόλυνση των σφαγίων, το πρόβλημα όμως εξακολουθεί να υπάρχει λόγω του διαφορετικού μεγέθους των σφαγίων (Bolder, 2007; Mead 1989). Για να περιοριστεί η μόλυνση, ακολουθεί πλύσιμο των σφαγίων με καταιονισμό ψυχρού νερού αμέσως μετά τον εκσπλαχνισμό. Οι μικροοργανισμοί που παραμένουν μετά το στάδιο της έκπλυσης είτε είναι "κρυμμένοι" μέσα στις κρύπτες του δέρματος είτε είναι προσκολλημένοι σε αυτό (Bolder, 2007; Mead, 1989).

Μόλυνση στη δεξαμενή ψύξης

Η ψύξη των σφαγίων θεωρείται απαραίτητη, γιατί αναστέλλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, μειώνει τη δραστηριότητα των ενζύμων στους μύες και επομένως συντελεί στην επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης του κρέατος (Κοϊδής, 2003). Κατά την ψύξη των πουλερικών στη δεξαμενή παρατηρείται επίσης και ελάττωση του επιφανειακού μικροβιακού φορτίου (Byrd και McKee, 2005). Οι διάφοροι μικροοργανισμοί απομακρύνονται μηχανικά και διασπείρονται στο νερό της δεξαμενής και στη συνέχεια έχουν τη δυνατότητα να προσκολληθούν στην επιφάνεια άλλων σφαγίων με αποτέλεσμα τη διασπορά της μόλυνσης (Sarlin και συν., 1998). Η συνεχής ανανέωση του νερού και ο τακτικός έλεγχος της θερμοκρασίας του είναι οι δύο απαραίτητες προϋποθέσεις για την καλή υγιεινή κατάσταση του σφαγίου (Bryan και Doyle 1995).

Η χρήση του ψυχρού αέρα αντί του ψυχρού νερού θεωρείται αποτελεσματικότερη στη μείωση της επιμόλυνσης των σφαγίων κατά το στάδιο της ψύξης τους. Με τη χρήση της αερόψυξης αποφεύγεται η επιμόλυνση των σφαγίων από το νερό της δεξαμενής ψύξης (Byrd και McKee, 2005). Αρκετοί ερευνητές όμως υποστηρίζουν ότι η αερόψυξη προκαλεί αύξηση του βακτηριακού φορτίου του δέρματος του σφαγίου, επειδή για την εφαρμογή της, η θερμοκρασία του νερού στη δεξαμενή ζεματίσματος δεν πρέπει να υπερβαίνει τους 50° C περίπου (Bryan και Doyle 1995; Mead, 1989).

1.2.3 Παράγοντες μόλυνσης του κρέατος κατά τη επεξεργασία, συσκευασία, διακίνηση του και προετοιμασία του γεύματος

Επεξεργασία, συσκευασία και διακίνηση

Κατά την επεξεργασία, το κρέας των πουλερικών μπορεί να μολυνθεί είτε από τους χειριστές τροφίμων (χέρια, ρούχα κ.α.) είτε από το μολυσμένο περιβάλλον στα εργαστήρια επεξεργασίας (μαχαίρια, ταινίες μεταφοράς, μηχανήματα, σκεύη, πάγκοι εργασίας, κλπ) (Κοϊδής, 2003). Κατά τη

συσκευασία, το κρέας μπορεί να μολυνθεί από τα μολυσμένα υλικά συσκευασίας και συσκευαστικά μηχανήματα και από το προσωπικό που τα χειρίζεται όταν δεν τηρούνται οι κανόνες υγιεινής (Bolder, 2007; Griffith και Redmond, 2005). Τέλος κατά τη διακίνηση, η μόλυνση του κρέατος μπορεί να γίνει από τα ακάθαρτα ή ακατάλληλα οχήματα μεταφοράς, ή από τις ακατάλληλες προθήκες των καταστημάτων.

Προετοιμασία του γεύματος

Μετά τη διακίνηση του, το κρέας των πουλερικών θα καταλήξει είτε στις οικιακές κουζίνες είτε σε χώρους μαζικής εστίασης. Η πιθανή όμως ύπαρξη παθογόνων βακτηρίων στην επιφάνεια του κρέατος των πουλερικών σε συνδυασμό με τα σφάλματα χειρισμού ή επεξεργασίας των ατόμων που έρχονται σε επαφή με αυτό μπορεί να προκαλέσει την διασπορά των μικροοργανισμών στο περιβάλλον των οικιακών κουζινών ή των χώρων μαζικής εστίασης (Griffith και Redmond, 2005). Τα σφάλματα που γίνονται συνήθως κατά την παρασκευή των τροφίμων στην προετοιμασία του γεύματος και μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση κρούσματος τροφικής δηλητηρίασης είναι τα εξής (Bryan και Doyle, 1995; DeDonder και συν., 2009; Fisher και συν., 2007; Griffith και Redmond, 2005; Κοϊδής, 2003):

- Χειρισμός ωμών τροφίμων (κρέας) και κατόπιν χωρίς τη λήψη απαραίτητων μέτρων υγιεινής, χειρισμός μαγειρευμένων τροφίμων
- Ατελής απόψυξη των κατεψυγμένων τροφίμων πριν τη θερμική τους επεξεργασία
- Συντήρηση μαγειρευμένων τροφίμων στο ψυγείο (4°C) σε μεγάλους ανοικτούς περιέκτες
- Παραμονή των μαγειρευμένων τροφίμων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μεγάλο χρονικό διάστημα (άνω των 3 ωρών)
- Παρασκευή του τροφίμου από την προηγούμενη ημέρα και συντήρηση του σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

- Ατελής θερμική επεξεργασία του κρέατος
- Ατελής αναθέρμανση των μαγειρευμένων τροφίμων
- Συντήρηση μαγειρευμένων τροφίμων σε θερμοθαλάμους που λειτουργούν σε χαμηλές θερμοκρασίες
- Χειρισμός των τροφίμων από χειριστές “φορείς”
- Πλημμελής καθαρισμός και εξυγίανση των επιφανειών εργασίας και του εξοπλισμού (ξύλινες επιφάνειες κοπής του κρέατος, μαχαίρια, σκεύη, μηχανές κοπής)
- Χρήση των ίδιων επιφανειών εργασίας και εξοπλισμού (μαχαίρια, κ.α.) σε ωμά και μαγειρευμένα ή έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα
- Χρήση των ίδιων υλικών καθαριότητας (σπόγγοι) σε επιφάνειες χειρισμού ωμών και μαγειρευμένων τροφίμων

Πρέπει λοιπόν οι καταναλωτές και όλο το ειδικό προσωπικό που ασχολείται με τα τρόφιμα, να χειρίζονται το κρέας σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής, ώστε να μειώνονται όσον είναι δυνατόν οι πιθανότητες πρόκλησης τροφοδηλητηρίασης.

1.3 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Τα γενικά χαρακτηριστικά, τα ποσοστά μόλυνσης που έχουν αναφερθεί και ο τρόπος μόλυνσης των σφαγίων και του κρέατος των πουλερικών από τα παθογόνα βακτήρια στα οποία επικεντρώθηκε η παρούσα μελέτη (*Salmonella* spp. και *L. monocytogenes*), περιγράφονται στη συνέχεια.

1.3.1 Salmonella spp.

Οι *Salmonella* spp. είναι Gram αρνητικά, προαιρετικά αναερόβια, μη σπορογόνα, ραβδόμορφα βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*. Αν και τα περισσότερα μέλη του γένους *Salmonella* είναι κινητά, υπάρχουν και ορότυποι όπως οι *S. Pullorum* και *S. Gallinarum* που είναι ακίνητοι (D'aoust και Maurer, 2007). Οι μικροβιολόγοι συχνά αναφέρονται στους 2.400 περίπου ορότυπους *Salmonella* σαν να ανήκουν σε ένα είδος, στην πράξη όμως όλες οι σαλμονέλες έχουν κατηγοριοποιηθεί σε δύο είδη, *S. enterica* και *S. bongori*. Οι 2.000 ορότυποι που ανήκουν στο είδος *S. enterica* διακρίνονται περαιτέρω σε πέντε υποείδη (Le Minor και Poroff, 1987), τα οποία είναι τα εξής: υποείδος II (*S. enterica* subsp. *salamae*), υποείδος IIIa (*S. enterica* subsp. *arizonae*), υποείδος IIIb (*S. enterica* subsp. *diarizonae*), υποείδος IV (*S. enterica* subsp. *houtenae*) και υποείδος VI (*S. enterica* subsp. *indica*). Το υποείδος V αναβαθμίστηκε σε επίπεδο είδους ως *S. bongori* (Reeves και συν., 1989).

Για καθαρά επιδημιολογικούς σκοπούς οι σαλμονέλες μπορούν να διαιρεθούν σε 3 ομάδες (Jay και συν., 2005):

1. Στους ορότυπους που προσβάλλουν μόνο τον άνθρωπο και περιλαμβάνει τους *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* και *S. Paratyphi C*. Στην ομάδα αυτή ανήκουν ουσιαστικά οι αιτιολογικοί παράγοντες του τυφοειδούς και του παρατυφοειδούς πυρετού που είναι οι πιο σοβαρές ασθένειες που μπορούν να προκληθούν από τις σαλμονέλες.
2. Στους ορότυπους που προσαρμόζονται ανάλογα με τον ξενιστή (μερικοί εκ των οποίων είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο και μπορούν να απομονωθούν από τα τρόφιμα). Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται οι *S. Gallinarum* (πουλερικά), *S. Dublin* (αγελάδα), *S. Abortus-equi* (άλογο), *S. Abortus-ovis* (πρόβατο) και *S. Choleraesuis* (χοίρος).
3. Στους μη προσαρμοσμένους ορότυπους. Είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο και τα ζώα και είναι οι κυρίως υπεύθυνοι για τις τροφιμογενείς λοιμώξεις (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* κ.α.)

Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης των *Salmonella* spp. είναι οι 37°C, Υπάρχουν, ωστόσο, στελέχη που μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες 2 - 4°C, ή και σε θερμοκρασίες $\leq 54^\circ\text{C}$ (D'aoust και Maurer, 2007). Αναπτύσσονται σε τιμές pH από 4,5 έως 9,5, με την άριστη τιμή pH για την ανάπτυξη τους να είναι από 6,5 έως 7,5. Η ανάπτυξη τους αναστέλλεται σε τρόφιμα με τιμή συντελεστή ενεργού ύδατος $a_w < 0,93$ ή με περιεκτικότητα σε NaCl 3-4 % (D'aoust, 1989).

Οι σαλμονέλες δίνουν αρνητική αντίδραση στη δοκιμή της οξειδάσης και θετική στη δοκιμή της καταλάσης, παράγουν υδρόθειο, αποκαρβοξυλιώνουν τη λυσίνη (εκτός *S. Paratyphi A*) και δεν υδρολύουν την ουρία (D'aoust και Maurer, 2007). Ζυμώνουν τη γλυκόζη και άλλους μονοσακχαρίτες, με ταυτόχρονη παραγωγή αερίου, ενώ δεν έχουν γενικώς την ικανότητα να ζυμώνουν τη λακτόζη και τη σακχαρόζη. Υπάρχουν ωστόσο κάποιοι ορότυποι οι οποίοι ζυμώνουν και τη λακτόζη (*S. Arizonae*). Χρησιμοποιούν συνήθως τα αμινοξέα ως πηγή αζώτου αν και στην περίπτωση της *S. Typhimurium* χρησιμοποιούνται αποκλειστικά νιτρικά, νιτρώδη άλατα και NH_3 για τον ίδιο σκοπό (Jay και συν., 2005).

Οι σαλμονέλες είναι ευρύτατα διαδεδομένες στο περιβάλλον και γι αυτό η μόλυνση των διαφόρων τροφίμων θεωρείται εύκολη. Το κρέας των πουλερικών, από πλευράς μόλυνσης, κατέχει σημαντική θέση εξαιτίας των συνθηκών εκτροφής των ζωντανών πουλερικών και του τρόπου προετοιμασίας των σφαγίων. Δεν θα πρέπει ωστόσο να υποβαθμίζεται η σημασία του χοιρινού και του μοσχαρίσιου κρέατος που αποτελούν επίσης ορισμένες φορές το υπεύθυνο τρόφιμο σε τροφοδηλητηριάσεις από σαλμονέλα. Η μόλυνση των ζωντανών πουλερικών είναι δυνατό να συμβεί από την πρώτη ημέρα της ζωής τους και προέρχεται από τη στρωμνή, την τροφή (εκτός εάν έχει υποστεί θέρμανση), το νερό, τα τρωκτικά, τις μύγες, τη σκόνη κλπ. (Byrd και McKee, 2005; Bryan και Doyle, 1995; D' aust, 1989; Simonsen, 1989; Tinker και συν., 2005). Τα μολυσμένα πουλερικά, αν και δεν έχουν συνήθως εμφανή συμπτώματα λοίμωξης, απεκκρίνουν τον υπεύθυνο μικροοργανισμό και τον διασπείρουν με τα κόπρανά τους στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να μολύνονται και τα υγιή πουλερικά του σμήνους. Στη συνέχεια,

και ιδιαίτερα κατά τη μεταφορά τους στο σφαγείο, η απέκκριση των κοπράνων γίνεται εντονότερη λόγω στρεσικών παραγόντων, γεγονός που συντελεί στην εξάπλωση της μόλυνσης (Bryan, 1989; Byrd και McKee, 2005; Tinker και συν., 2005). Το πρόβλημα της μόλυνσης συνεχίζεται και μετά την θανάτωση των πουλερικών γεγονός που οφείλεται στον τρόπο προετοιμασίας των σφαγίων. Έχει παρατηρηθεί ότι πουλερικά που την προηγούμενη ημέρα της σφαγής τους ήταν απαλλαγμένα από σαλμονέλες, να είναι μολυσμένα στο τέλος της σφαγής ως έτοιμα πλέον σφάγια. (Bolder, 2007).

Πρόσφατα δημοσιοποιήθηκαν τα αποτελέσματα μιας έρευνας που διενεργήθηκε το 2008 στα 26 κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (εκτός της Ελλάδας), στη Νορβηγία και στην Ελβετία και αφορούσε την παρουσία της σαλμονέλας στα σφάγια ορνιθίων (EFSA, 2011). Ο συνολικός επιπολασμός της σαλμονέλας ήταν 12,2% (13,1% στα κράτη μέλη της Ε.Ε.) και κυμαινόταν από 0% (Δανία, Εσθονία, Φινλανδία, Λουξεμβούργο, Νορβηγία) έως 85,7% (Ουγγαρία). Η κατανομή των οροτύπων της σαλμονέλας διέφερε μεταξύ των κρατών μελών και των υπολοίπων κρατών που συμμετείχαν στην έρευνα. Οι επικρατέστεροι ορότυποι ήταν οι *S. Infantis*, *S. Enteritidis* και *S. Typhimurium*. Αν και τα περισσότερα στελέχη του οροτύπου *S. Infantis* αφορούσαν ένα κράτος μέλος (Ουγγαρία), ο ορότυπος αυτός ήταν ο πιο διαδεδομένος και η παρουσία του επιβεβαιώθηκε σε 15 χώρες. Ο ορότυπος *S. Enteritidis* απομονώθηκε από 14 κράτη και ήταν ο επικρατέστερος ορότυπος σε 5 από αυτά επιβεβαιώνοντας τον ρόλο του ως ο σημαντικότερος ορότυπος σαλμονέλας που απομονώθηκε από κοτόπουλα στην Ευρώπη. Η κατανομή των οροτύπων της σαλμονέλας που απομονώθηκαν από τα σφάγια των ορνιθίων ήταν αντίστοιχη και μάλιστα με παρόμοια ποσοστά με την κατανομή που παρατηρήθηκε στα σμήνη των ορνιθίων σε μια έρευνα που είχε διενεργηθεί στα ίδια κράτη 2 χρόνια νωρίτερα. Τα αποτελέσματα της έρευνας που αφορούσε τα σφάγια των ορνιθίων φαίνονται αναλυτικά στους πίνακες 1.1 και 1.2.

Πίνακας 1.1: Αποτελέσματα που αφορούν την παρουσία της *Salmonella* spp. σε σφάγια ορνιθίων στα κράτη μέλη της Ε.Ε. το έτος 2008 (EFSA, 2011).

Χώρα	Δείγματα			Αριθμός οροτύπων
	Αριθμός	Αριθμός θετικών	% θετικών	
Αυστρία	408	10	2,5	6
Βέλγιο	380	77	20,3	12
Βουλγαρία	316	85	26,9	16
Κύπρος	357	38	10,7	8
Τσεχία	422	23	5,5	7
Δανία	396	0	0	0
Εσθονία	102	0	0	0
Φινλανδία	369	0	0	0
Γαλλία	422	32	7,6	13
Ουγγαρία	321	275	85,7	5
Γερμανία	432	76	17,6	14
Ιρλανδία	394	39	9,9	1
Ιταλία	393	66	16,8	13
Λετονία	122	6	4,9	1
Λιθουανία	374	26	7,0	8
Λουξεμβούργο	13	0	0	0
Μάλτα	367	77	21,0	7
Ολλανδία	429	43	10,0	9
Πολωνία	419	107	25,5	11
Πορτογαλία	421	47	11,2	4
Ρουμανία	357	17	4,8	6
Σλοβακία	422	91	21,6	10
Σλοβενία	413	7	1,7	3
Ισπανία	389	58	14,9	14
Σουηδία	410	1	0,2	1
Ηνωμένο Βασίλειο	401	14	3,5	9
Ευρωπαϊκή Ένωση	9.249	1.215	13,1	56
Ελβετία	390	10	2,6	5
Νορβηγία	396	0	0	0
Σύνολο	10.035	1.225	12,2	56

Πίνακας 1.2: Κατανομή της συχνότητας των 20 επικρατέστερων οροτύπων *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από μολυσμένα σφάγια ορνιθίων στην Ε.Ε. το έτος 2008 (EFSA, 2011).

Ορότυποι	Σφάγια ορνιθίων (Συνολικός αριθμός =1.225)		Αριθμός χωρών
	N	%	
S. Infantis	358	29.2	15
S. Enteritidis	166	13.6	14
S. Kentucky	76	6.2	6
S. Typhimurium	54	4.4	10
S. Bredeney	53	4.3	7
S. Virchow	50	4.1	6
S. Hadar	47	3.8	9
S. Paratyphi B var. Java	46	3.8	3
S. Agona	37	3.0	10
S. Indiana	35	2.9	6
S. Montevideo	32	2.6	7
S. Mbandaka	30	2.4	10
S. Blockley	22	1.8	5
S. 4,12:d:-	21	1.7	1
S. Thompson	21	1.7	5
S. 4,[5],12:i:-	15	1.2	4
S. Livingstone	12	1.0	4
S. 6,7:-:-	11	0.9	2
S. Ohio	11	0.9	5
S. Derby	10	0.8	3
Υπόλοιποι	95	7.7	-
Μη ταυτοποιημένοι ορότυποι <i>Salmonella</i>	55	4.5	6

1.3.2 Listeria spp. και Listeria monocytogenes

Η λιστέρια είναι ένα Gram θετικό, αερόβιο ή και προαιρετικά αναερόβιο, ραβδόμορφο, μη σπορογόνο βακτήριο. Περιλαμβάνει έξι είδη από τα οποία τα δύο μόνο είναι παθογόνα (*L. monocytogenes sensu stricto* και *L. ivanovii*), ενώ τα υπόλοιπα είναι μη παθογόνα (*L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* και *L. grayi*) (Wagner και McLauchlin, 2008). Η *L. monocytogenes* είναι ένα ιδιαίτερης σημασίας παθογόνο βακτήριο για τον άνθρωπο και υπεύθυνο για την πρόκληση της λιστερίωσης, ενώ η *L. ivanovii* θεωρείται ότι είναι πρωτίστως παθογόνος για τα ζώα (Swaminathan και συν., 2007). Το βακτήριο φέρει περίτριχες βλεφαρίδες στις οποίες οφείλεται η χαρακτηριστική κίνηση του. Η κινητικότητα αυτή όμως παρατηρείται μόνο όταν η καλλιέργεια του μικροοργανισμού γίνεται στους 20-25°C και όχι στους 37°C (Wagner και McLauchlin, 2008).

Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης της *Listeria* spp. είναι οι 30-37°C, ενώ τα όρια ανάπτυξης κυμαίνονται από <0°C, έως 45°C. Αναπτύσσεται σε τιμές pH από 5,2 έως 9, με άριστη ανάπτυξη στο ουδέτερο έως ελαφρώς αλκαλικό pH. Η ανάπτυξη της αναστέλλεται σε τρόφιμα με τιμή συντελεστή ενεργού ύδατος $a_w < 0,92$, ενώ είναι ανθεκτική σε υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών αλάτων και χλωριούχου νατρίου (10%) (Wagner και McLauchlin, 2008).

Όλα τα είδη του γένους *Listeria* δίνουν θετική τη δοκιμή της καταλάσης αλλά όχι της οξειδάσης, θετικές τις δοκιμές του ερυθρού του μεθυλενίου και Voges-Proskauer, δεν παράγουν ινδόλη, δεν μπορούν να αξιοποιήσουν τα κιτρικά άλατα και δεν ρευστοποιούν τη ζελατίνη. Υδρολύουν την αργινίνη παράγοντας αμμωνία, παράγουν υδρόθειο, β-D-γαλακτοσιδάση και αλκαλική φωσφατάση και ανάγουν το κυανό του μεθυλενίου (Seeliger και Jones, 1986).

Η λιστέρια παράγει οξύ αλλά όχι αέριο από μια μεγάλη ποικιλία σακχάρων και κυρίως από τη γλυκόζη. Ο καταβολισμός της γλυκόζης γίνεται αερόβια και αναερόβια με τη μεταβολική οδό Embden-Meyerhof. Τελικό προϊόν της αναερόβιας διάσπασης της γλυκόζης είναι κυρίως το γαλακτικό

οξύ, ενώ της αερόβιας το πυροσταφυλικό οξύ, η ακετοΐνη, το γαλακτικό οξύ και άλλα τελικά προϊόντα (Παπά, 1996).

Είναι ένας μικροοργανισμός που είναι ευρύτατα διαδεδομένος στο περιβάλλον, ιδιαίτερα στα φυτά και το έδαφος. Κύριες πηγές μόλυνσης της λιστέριας είναι το έδαφος, τα χόρτα, το νερό, τα μολυσμένα οικόσιτα και άγρια ζώα. Η κύρια οδός μετάδοσης για τον άνθρωπο και τα ζώα πιστεύεται ότι είναι μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων και ζωοτροφών. Μπορεί ωστόσο η μόλυνση να μεταδοθεί και άμεσα από τα μολυσμένα ζώα στους ανθρώπους, καθώς και μεταξύ των ανθρώπων. Μια επαρκής θερμική επεξεργασία καταστρέφει τη λιστέρια, ωστόσο η ικανότητα της να πολλαπλασιάζεται ακόμα και σε θερμοκρασίες ψύξης προκαλεί μια σχετική ανησυχία όσον αφορά τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (RTE – Ready to Eat) με παρατεταμένη διάρκεια συντήρησης (EFSA, 2011).

Τρόφιμα που είναι δυνατό να είναι μολυσμένα με *L. monocytogenes* είναι τα μαλακά τυριά, το μη παστεριωμένο γάλα, τα παγωτά, τα πουλερικά, τα αλλαντικά, τα αλιεύματα (ιδιαίτερα τα καπνιστά), οι σαλάτες λαχανικών και τα έτοιμα σάντουιτς (Wagner και McLauchlin, 2008). Στα σφάγια των πουλερικών η *L. monocytogenes* απομονώνεται σε ποσοστά 15-80% ανάλογα με τη μέθοδο δειγματοληψίας (WHO, 1988) και η μέση συχνότητα είναι περίπου στο 17% (Jay, 1996).

Σε πιο πρόσφατες έρευνες, τα ποσοστά που αφορούσαν την απομόνωση της *L. monocytogenes* κυμαίνονταν από 4,3% στην Κορέα (Beak και συν., 2000) έως 75% στην Εσθονία (Praakle-Amin και συν., 2006). Σε χώρες με αντίστοιχες κλιματολογικές συνθήκες με την Ελλάδα, όπως η Πορτογαλία (Antunes και συν., 2002), η Ισπανία (Capita και συν., 2000; Vitas και συν., 2004) και η Ιταλία (Pesavento και συν., 2010) τα ποσοστά απομόνωσης της *L. monocytogenes* από σφάγια ορνιθίων ήταν 41%, 32% - 36,1% και 24,5%, αντιστοίχως. Στην Ελλάδα, σε έρευνες που έγιναν από τους Πανούλη και συν. (1990) και Παπά και συν. (1994) σε σφάγια ορνιθίων η *Listeria monocytogenes* απομονώθηκε σε ποσοστά 38,5% και 47%, αντιστοίχως.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε 7 πτηνοσφαγεία στη Δανία (Ojeningi και συν., 1996), η *L. monocytogenes* απομονώθηκε από διαφορετικά προϊόντα ορνίθιου κρέατος σε ποσοστά που κυμάνθηκαν από 0,3 έως 18,7%, με μέσο όρο 8%. Το βακτήριο όμως απομονώθηκε και από τον εξοπλισμό των σφαγείων αυτών μετά το καθαρισμό και την εξυγίανση τους το πρωί πριν από την έναρξη της παραγωγής. Το γεγονός αυτό δείχνει πως το περιβάλλον των σφαγείων, εξαιτίας ανεπαρκούς εφαρμογής προγραμμάτων καθαρισμού και εξυγίανσης, μπορεί να συμβάλλει στη μόλυνση των κοτόπουλων, ενώ τα μολυσμένα κοτόπουλα συμβάλλουν ίσως σε μικρότερο βαθμό (Ojeningi και συν., 1996).

1.4 Ασφάλεια – επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης του κρέατος των πουλερικών

Η απαίτηση των καταναλωτών για πιο ασφαλή τρόφιμα, τα μικροβιολογικά όρια που τίθενται από την νομοθεσία και η δυνατότητα εξαγωγών σε συνδυασμό με τους κανόνες του διεθνούς εμπορίου είναι μερικοί από τους λόγους που έχουν οδηγήσει τις μονάδες επεξεργασίας του κρέατος από κοτόπουλο στην αναζήτηση «νέων» τεχνολογιών με σκοπό να μειώσουν το μικροβιακό φορτίο του τελικού προϊόντος και ταυτόχρονα να επιμηκύνουν τον χρόνο συντήρησής του. Μέθοδοι που καταστρέφουν ή μειώνουν σε σημαντικό βαθμό τον πληθυσμό των παθογόνων βακτηρίων που βρίσκονται στην επιφάνεια των σφαγίων, όπως η Σαλμονέλα, η Λιστέρια και το Καμπυλοβακτηρίδιο συνεχίζουν να αποτελούν αντικείμενο σύγχρονων ερευνητικών μελετών.

Παρόλο που ένα μεγάλο φάσμα φυσικών και χημικών μεθόδων έχει αποδειχτεί ότι είναι αποτελεσματικές έναντι των παθογόνων βακτηρίων που απομονώνονται από το κοτόπουλο, ένας μικρός μόνο αριθμός από αυτές έχει εφαρμοστεί στην πράξη. Οι πιο σημαντικές μέθοδοι είναι η χρήση του χλωρίου και των χλωριούχων ενώσεων, των οργανικών οξέων και των

αλάτων του, του όζοντος, του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ανθρακικό νάτριο, των φωσφορικών αλάτων, η επεξεργασία του σφαγίου με αέρα (air scrubbing), η χρήση υπερήχων, η ακτινοβολήση, η συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες και τέλος η χρήση οξυγαλακτικών καλλιέργειών, ή των «φυσικών» προστατευτικών ουσιών όπως η χιτοζάνη, η ρευτερίνη και η λακτοφερρίσίνη Β. Στη συνέχεια περιγράφεται αναλυτικά η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ως προστατευτικές καλλιέργειες.

1.4.1 Προστατευτικές οξυγαλακτικές καλλιέργειες

Μέχρι πρόσφατα, οι προσπάθειες για τη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων στηρίζονταν στην έρευνα για πιο αποτελεσματικά χημικά συντηρητικά ή για την εφαρμογή πιο δραστικών φυσικών μεθόδων. Ωστόσο, η χρήση των παραπάνω μεθόδων έχει και κάποια μειονεκτήματα. Οι περισσότερες από τις χρησιμοποιούμενες συντηρητικές ουσίες παρουσιάζουν κάποια τοξικότητα, ενώ, όπως και οι φυσικές μεταχειρίσεις, μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τις οργανοληπτικές ιδιότητες και τη διατροφική αξία των τροφίμων. Εξάλλου, η σύγχρονη τάση των καταναλωτών είναι να προτιμούν τρόφιμα που είναι ασφαλή από πλευράς παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών αλλά έχουν υποστεί τη ελάχιστη δυνατή επεξεργασία, χωρίς την προσθήκη πρόσθετων και συντηρητικών ουσιών.

Ως απάντηση στην τάση αυτή των καταναλωτών η σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων προσπαθεί να αντικαταστήσει τις παραδοσιακές μεθόδους ελέγχου των παθογόνων και σαπροφυτικών οργανισμών με νέες μεθόδους, διατηρώντας ωστόσο στο ίδιο υψηλό επίπεδο ή και βελτιώνοντας ακόμα τις προδιαγραφές ασφάλειας των προϊόντων. Στο πλαίσιο αυτό, η βιοπροστασία παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως μια εναλλακτική μέθοδος βελτίωσης της ασφάλειας και επιμήκυνσης της διάρκειας συντήρησης των τροφίμων. Όπως αναφέρεται από τους Montville και Chikindas (2007) με τον όρο βιοπροστασία ορίζεται η χρήση μικροοργανισμών, των μεταβολικών τους προϊόντων ή και των δύο με σκοπό τη συντήρηση των τροφίμων που δεν ανήκουν στην κατηγορία των προϊόντων

ζύμωσης. Όπως στα προϊόντα ζύμωσης, έτσι και στην εφαρμογή της βιοπροστασίας, οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην βιοπροστασία έχει καθιερωθεί και θεωρούνται πλέον ιδανική επιλογή για την εφαρμογή τους ως προστατευτικές καλλιέργειες γιατί (Maragkoudakis και συν., 2009):

- αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας των περισσότερων τροφίμων
- αποτελούν μέρος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας των ανθρώπων και των ζώων
- έχουν μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης

1.4.1.1 Οξυγαλακτικά Βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weisella* (Axelsson, 2004). Αποτελούν μια ομάδα Gram-θετικών βακτηρίων που παρουσιάζουν κοινά μορφολογικά, μεταβολικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Η ταξινόμηση τους σε διαφορετικά γένη στηρίζεται κυρίως στη μορφολογία τους, στο τρόπο της ζύμωσης της γλυκόζης, στην ικανότητα ανάπτυξης τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, στο είδος του οξέος που παράγουν κατά τη ζύμωση τους, στην ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και στην ανθεκτικότητα τους σε όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον. Είναι μη κινητά, μη σπορογόνα, ραβδόμορφα ή σε σχήμα κόκκου βακτήρια που έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν τους υδατάνθρακες και να παράγουν γαλακτικό οξύ ως το επικρατέστερο τελικό τους προϊόν (Aguirre και Collins, 1993) από το οποίο και πήραν την ονομασία τους. Ανάλογα με τη μεταβολική τους δραστηριότητα στη ζύμωση των υδατανθράκων και τα τελικά προϊόντα που παράγονται από αυτή τη ζύμωση, τα οξυγαλακτικά βακτήρια χωρίζονται σε ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά βακτήρια. Είναι μικροοργανισμοί που μπορούν να αναπτύσσονται είτε σε αερόβιο είτε σε αναερόβιο περιβάλλον και

παρουσιάζουν αρνητική αντίδραση στη δοκιμή της καταλάσης και της οξειδάσης (Salminen et al., 1996).

1.4.1.2 Ταξινόμηση και ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η κλασική ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων βασίστηκε στα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, στα οποία περιλαμβάνονται η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, τα λιπαρά οξέα του κυττάρου και άλλα χαρακτηριστικά. Ωστόσο, με αυτό τον τρόπο πολλά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων βρέθηκαν να έχουν ταυτοποιηθεί και ταξινομηθεί λανθασμένα ή να ακολουθούν λανθασμένη ονοματολογία. Δύο παράγοντες συνετέλεσαν κυρίως στην εμφάνιση αυτού του προβλήματος: α) η ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων με βάση φαινοτυπικά κριτήρια και β) η ύπαρξη μεγάλου αριθμού συγγενών ειδών τα οποία δεν μπορούσαν να διαχωριστούν με βάση φαινοτυπικά κριτήρια ή με μη ειδικές γενετικές αναλύσεις, όπως π.χ. είναι η ποσοστιαία ανά γραμμομόριο περιεκτικότητα του DNA σε βάσεις γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C) (Klaenhammer, 2007).

Η φυλογενετική ανάλυση αναγνωρίζεται ευρέως ως το ισχυρότερο εργαλείο για την ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Zoetendal και συν., 1998). Η ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων τις τελευταίες δεκαετίες έχει βοηθήσει σημαντικά στη ταξινόμηση και ταυτοποίηση ειδών αλλά και απομονωμένων στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η συσσωρευμένη πληροφορία που υπάρχει όσον αφορά τις αλληλουχίες του rRNA αποτελεί μια διαρκώς αναπτυσσόμενη πηγή πληροφόρησης για τη συγκριτική ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Μέχρι τώρα, με τη φυλογενετική ανάλυση του rRNA έχουν αναγνωρισθεί 54 διαφορετικά είδη του γένους *Lactobacillus* και 31 είδη του γένους *Bifidobacterium* (Tannock, 1999). Ο συνδυασμός των πληροφοριών της φυλογενετικής ανάλυσης με άλλα χαρακτηριστικά (φαινότυπος) των οξυγαλακτικών βακτηρίων μπορεί να βοηθήσει στην όσο το δυνατόν ακριβέστερη ταξινόμηση τους. Ποικίλες μοριακές μέθοδοι, που στηρίζονται στην αλληλούχιση του DNA, έχουν χρησιμοποιηθεί για την

ανάλυση συγκεκριμένων περιοχών των οπερονίων του rRNA ή συγκεκριμένων γονιδίων των οξυγαλακτικών βακτηρίων (O'Sullivan, 1999):

- Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και αλληλούχιση ~1.500 ζευγών βάσεων (base pairs, bp) του 16S rRNA γονιδίου
- Εφαρμογή της PCR και αλληλούχιση ~450 bp της διαχωριστικής των γονιδίων περιοχής μεταξύ του 16S και του 23S rRNA γονιδίων (intergenic spacer region, ISR)
- Εφαρμογή της PCR και αλληλούχιση ~50 bp της μεταβλητής περιοχής του 16S rRNA γονιδίου με στόχο την ταυτοποίηση των μελών του συμπλέγματος του *Lactobacillus acidophilus* (Kullen και συν., 2000)
- Εφαρμογή της PCR και αλληλούχιση εναλλακτικών γονιδίων που βρίσκονται σε όλα τα βακτηριακά είδη, όπως το *recA* γονίδιο των bifidobacteria (Kullen και συν., 1997).

Τα τελευταία χρόνια, η αυξανόμενη εφαρμογή τεχνικών μοριακής βιολογίας έχει καταστήσει εύκολη και προσιτή την ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων με φυλογενετική ανάλυση. Η εφαρμογή της αναμένεται να αποκαλύψει και νέα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που μέχρι τώρα δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν με την κλασική ταξινόμηση τους (Klaenhammer, 2007). Η ανάλυση της DNA αλληλουχίας των οπερονίων του rRNA των στελεχών που κατηγοριοποιούνταν στο είδος *Lactobacillus acidophilus* αποκάλυψε την ύπαρξη έξι στενά συγγενικών ειδών που αποτελούν το σύμπλεγμα "Acidophilus": *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* και *L. johnsonii* (Johnson και συν., 1980; Klaenhammer και συν., 2005; Lauer και συν., 1980).

1.4.1.3 Αντιμικροβιακή δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η ανταγωνιστική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων συνίσταται στην αναστολή που προκαλούν λόγω διατροφικού ανταγωνισμού και λόγω της

παραγωγής ενός ή περισσότερων αντιμικροβιακών μεταβολιτών όπως είναι τα οργανικά οξέα (γαλακτικό και οξικό οξύ), το διοξείδιο του άνθρακα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το διακετύλιο, τα αντιμικροβιακά ένζυμα, η ρευτερίνη και οι βακτηριοσίνες (Holzapfel και συν., 1995; Ray και Bhunia, 2008). Η παραγωγή των παραπάνω αντιμικροβιακών ουσιών μπορεί να γίνει ακόμα και σε θερμοκρασίες ψύξης χωρίς πολλαπλασιασμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Amezquita and Brashears, 2002).

A. Διατροφικός ανταγωνισμός

Η ανάπτυξη των βακτηρίων σε ένα τρόφιμο εξαρτάται από τον αριθμό των θρεπτικών ουσιών που είναι διαθέσιμες προς αυτά και από τον αριθμό των εμποδίων ή των συνθηκών που μπορεί να την παρεμποδίζουν (NaCl, pH, θερμοκρασία, κλπ). Αν ένα τρόφιμο ενοφθαλμιστεί με ένα μεγάλο αριθμό οξυγαλακτικών βακτηρίων που είναι ικανά να αναπτύσσονται στο συγκεκριμένο τρόφιμο, τότε η ανάπτυξη των άλλων βακτηρίων που χρησιμοποιούν τα ίδια θρεπτικά συστατικά θα ανασταλεί λόγω του ανταγωνισμού, ιδιαίτερα για τα θρεπτικά συστατικά που βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις (Granly Koch, 2004).

B. Οργανικά οξέα

Όπως προαναφέρθηκε, ο μεταβολισμός των υδατανθράκων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορεί να γίνει είτε ομοζυμωτικά, οπότε το γαλακτικό οξύ είναι το κύριο τελικό προϊόν, είτε ετεροζυμωτικά οπότε και άλλες ουσίες όπως το οξικό οξύ, το διοξείδιο του άνθρακα και η αιθανόλη παράγονται σε συνδυασμό με το γαλακτικό οξύ (Zourari et al., 1992).

Τα οργανικά οξέα είναι ευρέως γνωστό ότι έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Το γαλακτικό οξύ και το οξικό οξύ, δηλαδή τα δύο κύρια οργανικά οξέα που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αποτελούν τους πιο βασικούς και αποτελεσματικούς αντιβακτηριακούς

παράγοντες σε όξινα τρόφιμα όπως είναι τα αλλαντικά ζυμώσεως (Jay και συν., 2005).

Όπως έχει αναφερθεί από τους Adams και Moss (2008) τα οργανικά οξέα παρεμποδίζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη με δύο τρόπους:

α) με τη προκαλούμενη πτώση της τιμής του pH και

β) κυρίως με την παρουσία της αδιάστατης μορφής τους

Η μείωση της τιμής του pH έχει ως συνέπεια τη δημιουργία ενός δυσμενούς περιβάλλοντος για τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί ότι τα οργανικά οξέα έχουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με τα ανόργανα οξέα καθώς έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της οξύτητας ενός θρεπτικού υποστρώματος με ένα ισχυρό ανόργανο οξύ δεν προκαλεί τον ίδιο βαθμό παρεμπόδισης σε σχέση με τα οργανικά οξέα, ακόμα και σε χαμηλότερες τιμές pH από εκείνες που το γαλακτικό και το οξικό οξύ δρουν ικανοποιητικά (Adams και Moss, 2008).

Τα ασθενή οργανικά οξέα όταν βρίσκονται σε υδατικό διάλυμα δεν δίδονται πλήρως αλλά βρίσκονται σε μια ισορροπία μεταξύ της αδιάστατης και της εν διαστάσει μορφής, με το ποσοστό διάστασης να εξαρτάται από την τιμή του pH. Η αποτελεσματικότητά τους επομένως ως αντιμικροβιακές ουσίες είναι ισχυρότερη σε χαμηλές τιμές pH, καθώς ευνοείται η αδιάστατη μορφή του οξέως η οποία και μπορεί να διαπεράσει τη λιπόφιλη κυτταροπλασματική μεμβράνη του μικροβιακού κυττάρου (Cramer και Prestegard, 1977). Στο εσωτερικό του κυτταροπλάσματος το pH είναι υψηλό, που έχει σαν συνέπεια την διάσταση του οργανικού οξέως με αποτέλεσμα την οξίνιση του εσωτερικού του κυττάρου, την απελευθέρωση τοξικών ανιόντων και τη διατάραξη του ηλεκτροστατικού δυναμικού της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Ouwehand, 1998). Η όλη διαδικασία εντείνεται όσο μειώνεται το pH λόγω ύπαρξης μεγαλύτερης ποσότητας οξέος σε αδιάστατη μορφή (Adams και Moss, 2008).

Η παρεμποδιστική ικανότητα ενός οργανικού οξέος είναι συνάρτηση της σταθεράς διαστάσεως του (pK_a). Όσο πιο υψηλή είναι η σταθερά διαστάσεως, τόσο πιο υψηλό είναι το ποσοστό του οξέος που παραμένει αδιάστατο για δεδομένη τιμή pH και επομένως τόσο μεγαλύτερη είναι και η δραστηρότητά του (Adams, 1990). Από τα δύο κύρια ασθενή οργανικά οξέα που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (γαλακτικό και οξικό οξύ), το οξικό οξύ έχει την ισχυρότερη ανασταλτική δράση χάρη στην υψηλότερη σταθερά διάστασης του ($pK_a = 4,75$) σε σύγκριση με αυτή του γαλακτικού οξέος ($pK_a = 3,08$) σε μια δεδομένη συγκέντρωση και τιμή pH (Holzapfel και συν., 1995; Ouwehand, 1998).

Γ. Διοξειδίο του άνθρακα

Ένα από τα προϊόντα μεταβολισμού των ετεροζυμωτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι και το διοξειδίο του άνθρακα. Το διοξειδίο του άνθρακα μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα συντήρησης ενός τροφίμου με δύο τρόπους:

α) δημιουργεί αναερόβιο περιβάλλον αντικαθιστώντας το ατμοσφαιρικό οξυγόνο μέσα στη μάζα του προϊόντος

β) είναι το ίδιο ένας αντιμικροβιακός παράγοντας (Dixon και Kell, 1989)

Χαμηλή συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών, ενώ υψηλή συγκέντρωση μπορεί να προκαλέσει την παρεμπόδιση της ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών (Genigeorgis, 1985). Όπως προκύπτει και από την έρευνα των Korkeala και συν. (1991) η συσκευασία του κρέατος σε διοξειδίο του άνθρακα προκαλεί ελαφριά ανάσχεση της ανάπτυξης ή ακόμα και επιλογή στα είδη *Lactobacillus* που επικρατούν.

Ο μηχανισμός δράσης του CO_2 στους διάφορους ιστούς και τους μικροοργανισμούς δεν είναι ακόμα επακριβώς γνωστός. Οι επικρατέστερες απόψεις σύμφωνα με τον Garbutt (1997) για την δράση του είναι:

- Μειώνει το pH στο εσωτερικό των μικροβιακών κυττάρων

- Αναστέλλει τις ενζυμικές αντιδράσεις στο εσωτερικό των κυττάρων
- Αναστέλλει τη σύνθεση ενζύμων
- Διαταράσσει τη λειτουργικότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης

Ωστόσο, στη βιοπροστασία των προϊόντων κρέατος, η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων διοξειδίου του άνθρακα δεν είναι επιθυμητή καθώς μπορεί να προκαλέσει τη ρήξη των συσκευασιών ή τη δημιουργία σχισμών στη μάζα των προϊόντων (Granly Koch, 2004).

Δ. Υπεροξειδίου του υδρογόνου

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την αερόβια ζύμωση των υδατανθράκων. Έχουν ωστόσο και διάφορους ενζυμικούς μηχανισμούς αποδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου για να μειώνουν τη συγκέντρωσή του. Η αποτελεσματικότητα των ενζυμικών αυτών μηχανισμών ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών οξυγαλακτικών βακτηρίων, αν και συνήθως η παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ξεπερνάει την ικανότητα αποδόμησης του και επομένως συνεπάγεται την αύξηση της συγκέντρωσής του στο τρόφιμο (Granly Koch, 2004).

Το υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι ένας ιδιαίτερα αποτελεσματικός αντιμικροβιακός παράγοντας λόγω της ισχυρής οξειδωτικής του δράσης στο βακτηριακό κύτταρο και ιδιαίτερα στη κυτταροπλασματική μεμβράνη (Brashears και συν., 2005). Πιο συγκεκριμένα, το υπεροξειδίου του υδρογόνου προκαλεί την οξείδωση των σουλφυδριλικών ομάδων των πρωτεϊνών και των λιπιδίων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Juven και Pierson, 1996; Villegas και Gilliland, 1998). Παλιότερες θεωρίες ωστόσο αναφέρουν ότι το υπεροξειδίου του υδρογόνου προσβάλλει ειδικές περιοχές του βακτηριακού DNA (π.χ. τη μεθυλική ομάδα της θυμίνης, τα μόρια γουανίνης) και προκαλεί αντιστρεπτές ή μη αντιστρεπτές βλάβες, όπως απελευθέρωση νουκλεοτιδίων ή / και απόσπασση ολόκληρων τεμαχίων DNA (Ananthaswamy και Eisenstark, 1977; Byczkowski και Gessner, 1988).

Ο σχηματισμός και η συσσώρευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα και η αντιμικροβιακή του δράση έχει αποδειχθεί για τον *Staphylococcus aureus* (Dahiya και Speck, 1968) και για το γένος *Pseudomonas* (Price και Lee, 1970). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου ωστόσο έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά και με άλλα συστατικά των τροφίμων για τον σχηματισμό ουσιών με αντιμικροβιακή δράση. Στο νωπό γάλα π.χ., το υπεροξειδίο του υδρογόνου που παράγεται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορεί να αντιδράσει με το ενδογενές θειοκυανικό (thiocyanate), παρουσία της λακτοπεροξειδάσης, για το σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων οξειδωσης που έχουν ανασταλτική δράση έναντι των μικροοργανισμών. Ο μηχανισμός αυτός έχει μελετηθεί αναλυτικά (Condon, 1987) και ονομάζεται αντιβακτηριακό σύστημα της λακτοπεροξειδάσης. Σε άλλα τρόφιμα ωστόσο, η παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορεί να έχει και αρνητικές επιδράσεις. Στο κρέας π.χ. η παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορεί να αλλοιώσει τις οργανοληπτικές του ιδιότητες λόγω πράσινου ή καφέ χρωματισμού και της οξειδωσης του λίπους (Granly Koch, 2004).

E. Διακετύλιο

Το διακετύλιο είναι η ουσία που είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση βουτύρου. Παράγεται από τα είδη του γένους *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Lactococcus* (Jay και συν., 2005). Το διακετύλιο σχηματίζεται από το μεταβολισμό του κιτρικού οξέος μέσω πυροσταφυλικού οξέος (Axelsson και συν., 1989; Lindgren και Dobrogosz, 1990). Το διακετύλιο έχει αναφερθεί ότι είναι αποτελεσματικότερο όταν το pH είναι χαμηλότερο του 7 και σταδιακά καθίσταται ανενεργό σε τιμές του pH μεγαλύτερες του 7 (Jay, 1982). Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι το διακετύλιο έχει ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων, των ζυμών και των μυκήτων σε σχέση με τα Gram θετικά βακτήρια.

ΣΤ. Ρευτερίνη

Η ρευτερίνη είναι μια ουδέτερη ευρέως φάσματος αντιμικροβιακή ουσία που σχηματίζεται κατά την αναερόβια ανάπτυξη του *Lactobacillus reuteri* παρουσία γλυκερόλης (Axelsson και συν., 1989). Η ρευτερίνη αποτελεί ένα μίγμα δυναμικής ισορροπίας μεταξύ μονομερών, ενυδατωμένων μονομερών και κυκλικών διμερών μορφών της β-υδροξυπροπιοναλδεύδης. Οι ανασταλτικές ιδιότητες της ρευτερίνης συνίστανται στη δράση της στη σύνθεση του DNA, όπου δρα ως αναστολέας των δεσμευτικών υπομονάδων του υποστρώματος της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής (Brashears και συν., 2005).

Z. Βακτηριοσίνες

Με τον όρο βακτηριοσίνες περιγράφεται μια ορισμένη κατηγορία αντιμικροβιακών μεταβολιτών που έχουν πρωτεϊνική δομή, συντίθενται στα ριβοσωμάτια και εξάγονται από τα κύτταρα και εμφανίζουν βακτηριοκτόνο δράση εναντίον περιορισμένου αριθμού βακτηριακών γενών και ειδών, συνήθως ταξινομικά συγγενών με το παραγωγό στέλεχος (Cotter και συν., 2005). Η παραγωγή βακτηριοσινών αποτελεί χαρακτηριστικό πολλών στελεχών βακτηρίων, τόσο θετικών κατά Gram (π.χ. οξυγαλακτικά βακτήρια), όσο και αρνητικών κατά Gram όπως είναι οι κολισίνες και οι μικροσίνες από το είδος *E. coli* (Paragianni, 2003). Γενικά πρόκειται για μια ανομοιογενή ομάδα βιολογικά ενεργών ουσιών που παράγονται από διάφορες κατηγορίες μικροοργανισμών και η ταξινόμηση τους δεν στηρίζεται σε αυστηρώς καθορισμένα κριτήρια. Διαφέρουν τόσο στις βιοχημικές τους ιδιότητες όσο και στη χημική δομή, το μοριακό βάρος, το φάσμα δράσης, τον τρόπο δράσης και τις γενετικές τους καταβολές (Tagg και συν., 1976).

Η σημασία των βακτηριοσινών προκύπτει από το φάσμα της αντιμικροβιακής δράσης και την πιθανότητα εφαρμογής τους ως φυσικών συντηρητικών τροφίμων σε αντικατάσταση ή μείωση κάποιων χημικών αντιστοίχων (Barnby-Smith, 1992). Επειδή όμως είναι προφανές ότι η προσθήκη στα τρόφιμα ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών που

παράγουν βακτηριοσίνες όπως είναι η *E. coli* αντενδείκνυται, χρησιμοποιούνται τα οξυγαλακτικά βακτήρια ή οι βακτηριοσίνες που παράγονται από αυτά. Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν θεωρούνται επικίνδυνες λόγω προέλευσης (ουσίες GRAS: Generally Recognized As Safe) και, ως εκ τούτου, μπορούν να προστεθούν ή να παραχθούν μέσα στη μάζα ενός τροφίμου χωρίς ειδικούς περιορισμούς, με στόχο να δράσουν ως φυσικά συντηρητικά (Bhunia και συν., 1990).

Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν πολλά επιθυμητά χαρακτηριστικά που τις καθιστούν πολλά υποσχόμενες για τη χρήση τους ως φυσικές συντηρητικές ουσίες (Αναπου και συν., 2007):

- Είναι πρωτεϊνικής φύσεως και αδρανοποιούνται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα του γαστρεντερικού σωλήνα
- Είναι μη τοξικές στα πειραματόζωα που έχουν δοκιμαστεί και γενικά δεν προκαλούν ανοσοποιητικές αντιδράσεις
- Είναι ανενεργές έναντι των ευκαρυωτικών κυττάρων
- Είναι συνήθως θερμοανθεκτικές (μπορούν να διατηρήσουν την αντιμικροβιακή τους δράση ακόμα και μετά από παστερίωση ή αποστείρωση)
- Έχουν ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα επηρεάζοντας τα περισσότερα Gram θετικά βακτήρια (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) και κάποια τραυματισμένα Gram αρνητικά βακτήρια όπως η *Salmonella*
- Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή τους βρίσκονται συνήθως στα πλασμίδια, γεγονός το οποίο διευκολύνει τις γενετικές τροποποιήσεις με στόχο τον εμπλουτισμό ανάλογων φυσικών πεπτιδίων με επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Για όλους αυτούς τους λόγους, οι βακτηριοσίνες παρουσιάζουν τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον και έχουν αποτελέσει το αντικείμενο

επιστημονικής μελέτης πολυάριθμων ερευνητών για τη χρήση τους ως βιοπροστατευτικές ουσίες στα τρόφιμα. Χωρίς καμιά αμφιβολία, η παγκοσμίως εκτενέστερα μελετημένη βακτηριοσίνη είναι η νισίνη, η οποία και έχει βρει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων. Η νισίνη παράγεται από το *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, είναι εγκεκριμένη από το Υπουργείο Τροφίμων και Υγείας (FDA) των Η.Π.Α. και χρησιμοποιείται ως πρόσθετο σε περισσότερες από 48 χώρες, ιδιαίτερα σε επεξεργασμένα τυριά, σε γαλακτοκομικά προϊόντα και σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα (Αναπου και συν., 2007). Είναι αποτελεσματική έναντι αρκετών τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων όπως η *Listeria monocytogenes* και πολλών άλλων Gram θετικών σαπρόφυτων μικροοργανισμών (Thomas και συν., 2000).

Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις μέθοδοι ενσωμάτωσης των βακτηριοσινών στα τρόφιμα με στόχο να βελτιωθούν η ασφάλεια και η δυνατότητα συντήρησης τους (Deegan και συν., 2006): α) με τη χρησιμοποίηση καθαρής ή μερικώς καθαρής βακτηριοσίνης ως συστατικό του τροφίμου, β) με την ενσωμάτωση στο τρόφιμο ενός συστατικού που έχει προηγουμένως υποστεί ζύμωση από κάποιο μικροβιακό στέλεχος που παράγει βακτηριοσίνη, και γ) με αντικατάσταση μέρους ή ολόκληρης της καλλιέργειας εκκίνησης με καλλιέργεια που παράγει βακτηριοσίνη με στόχο την παραγωγή βακτηριοσίνης *in situ*.

Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κλάσεις, με τη δεύτερη κλάση να χωρίζεται σε τρεις υποκλάσεις (Klaenhammer, 1993). Η τέταρτη κλάση εξαιρέθηκε αργότερα (Nes και συν., 1996), αλλά επανήλθε με νεώτερη κατηγοριοποίηση (Garneau και συν., 2002).

Η **κλάση I** περιλαμβάνει τα λαντιβιοτικά, τα οποία είναι πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους (<5 kDa) που περιέχουν λανθιονίνη, β-μεθυλολανθιονίνη και άνυδρα αμινοξέα, ενώ τουλάχιστον δύο μέλη της ομάδας περιέχουν επίσης D-αλανίνη, και παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Ryan και συν., 1999). Εκτός της νισίνης, η οποία είναι το πιο γνωστό λαντιβιοτικό, στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων και η λακτισίνη 481 που παράγεται από

τον *L. lactis* (Piard και συν., 1992), η σιτολυσίνη από τον *Enterococcus faecalis* (Gilmore και συν., 1990) και η λακτισίνη 3147 από τον *L. lactis* (Ryan και συν., 1999). Με βάση τη δομή τους τα λαντιβιοτικά έχουν χωριστεί σε δύο διαφορετικούς τύπους (Sahl και Bierbaum, 1998):

- Ο τύπος A περιλαμβάνει τα επιμήκη, σε σχήμα κοχλία λαντιβιοτικά, με μοριακό βάρος 2-5 kDa, που φέρουν θετικό φορτίο και δρουν δημιουργώντας πόρους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στον τύπο αυτό ανήκει η λυσίνη
- Ο τύπος B περιλαμβάνει τα σφαιρικά λαντιβιοτικά με μοριακό βάρος ~2 kDa, που είναι αρνητικά ή καθόλου φορτισμένα και δρουν παρεμβαίνοντας σε σημαντικές ενζυμικές αντιδράσεις του κυττάρου. Λαντιβιοτικά του τύπου αυτού (μερσασιδίνη, ακταγκαρδίνη κ.α.) δρουν παρεμποδίζοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των Gram θετικών βακτηρίων (Sahl και συν., 1995).

Η **κλάση II** περιλαμβάνει θερμοανθεκτικά πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους (<10 kDa) που δεν περιέχουν λανθιονίνη και έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε μικρά αμινοξέα όπως η γλυκίνη (Ouwehand, 1998). Είναι συνήθως κατιονικά και λιγότερο συχνά αμφιφιλικά πεπτίδια, χαρακτηριστικά στα οποία οφείλεται η ικανότητα τους να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη (Nes και συν., 1996). Όπως προαναφέρθηκε η κλάση αυτή διαιρείται σε τρεις υποκλάσεις (Paragianni, 2003):

α) στην υπο-κλάση IIa με βακτηριοσίνες του τύπου της πεδιοσίνης που είναι δραστικές κατά της *Listeria* (π.χ. πεδιοσίνη PA1, σακασίνη A και P, λευκοσίνη A κ.α.)

β) στην υπο-κλάση IIb στην οποία ανήκουν βακτηριοσίνες που αποτελούνται από δύο πεπτίδια και η δράση τους εξαρτάται από τη συνεργική δράση των δύο κατιονικών πεπτιδίων που τις απαρτίζουν (π.χ. λακτοκοκκίνη-G)

γ) στην υπο-κλάση IIc με βακτηριοσίνες ενός πεπτιδίου που δεν παρουσιάζουν αντιλιστεριακή δράση. Στην υπο-κλάση αυτή περιλαμβάνονται όλες οι βακτηριοσίνες της κλάσης II που δεν μπορούν να συμπεριληφθούν σε

κάποια από τις δύο προηγούμενες υπο-κλάσεις και επομένως παρουσιάζει μια σχετική ποικιλομορφία (Eijsink, και συν., 2002).

Η **κλάση III** περιλαμβάνει πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους (>30 kDa) που είναι ευαίσθητες στις υψηλές θερμοκρασίες. Στην κλάση αυτή ανήκουν βακτηριοσίνες όπως η ελβετίνη J που παράγεται από τον *Lactobacillus helveticus* (Joerger και Klaenhammer, 1986) και η εντερολυσίνη που παράγεται από τον *Enterococcus faecium* (Nilson, 1999). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών αυτής της κλάσης παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος (Ouwehand, 1998).

Η **κλάση IV** περιλαμβάνει σύνθετες βακτηριοσίνες που αποτελούνται από πρωτεΐνες ενωμένες με λιπίδια ή καρβοξυλικές ομάδες, συστατικά απαραίτητα για τη δράση τους. Η ύπαρξη της κλάσης αυτής δεν είναι γενικότερα αποδεκτή, καθώς μπορεί να συμπεριλάβει πεπτιδία βακτηριοσίνης τα οποία δεν έχουν απομονωθεί κατάλληλα (Nes και συν., 1996). Όπως και με τις βακτηριοσίνες της κλάσης III, ο ακριβής μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών της κλάσης IV εξακολουθεί να ερευνάται (Ouwehand, 1998).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, M.R. 1990. Topical aspects of fermented foods. Trends in Food Science and Technology 1, 140-144.
- Adams, M.R. and Moss M.O. 2008. Food Microbiology. 3rd edition. RSC Publishing, Cambridge, UK, pp. 24-27, 317-320.
- Aguirre, M. and Collins, M.D. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. Journal of Applied Bacteriology 75, 95-107.
- Allen, V.M., Bull, S.A., Corry, J.E.L., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J.A., Whyte, R., Gonzalez, A., Elviss, N. and Humphrey, T.J. 2007. *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during

- processing in relation to flock colonization. *International Journal of Food Microbiology* 113, 54–61.
- Amezquita, A. and Brashears M. M. 2002. Competitive Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection* 65(2), 316-325.
- Ananou, S., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M. and Valdivia, E. 2007. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. In: *Communicating Current Research and Educational topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Mendez-Vilas (Ed.). Formatex, pp. 476-485.
- Ananthaswamy, H.N. and Eisenstark, A. 1977. Repair of hydrogen peroxide-induced single-strand breaks in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology* 130, 187-191.
- Antunes, P., Reu, C., Sousa, J. C., Pestana, N. and Peixe, L. 2002. Incidence and Susceptibility to Antimicrobials Agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* Isolated from Poultry Carcasses in Porto, Portugal. *Journal of Food Protection* 65 (12), 1888-1893.
- Axelsson, L., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. and Lindgren, S.E. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2, 131-136.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand (Eds.). 3rd edition. Markel Dekker, New York, pp. 1-66.
- Barnby-Smith, F.M. 1992. Bacteriocins: their applications in food preservation. *Trends in Food Science and Technology* 3, 133-137.

- Beak, S.Y., Lim, Y.S., Lee, D.H., Min, K.H., Kim, C.M. 2000. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea. *Journal of Food Protection* 63, 186-189.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. and Belden, E.L. 1990. Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H. *Journal of applied Bacteriology* 69, 211-215.
- Bolder, N.M. 1998. The microbiology of the slaughter and processing of poultry. In: *The microbiology of meat and poultry*. A. Davies and R. Board (Eds), Blackie Academic & Professional, London, U.K., pp.158-171.
- Bolder, N.M. 2007. Microbial challenges of poultry meat production. *World's Poultry Science Journal* 63, 401-411.
- Brashears, M.M., Amezcua, A. and Jaroni, D. 2005. Lactic acid bacteria and their use in animal feeding to improve food safety. *Advances in Food and Nutrition Research* 50, 1-31.
- Bryan, F.L. 1988. Risks associated with vehicles of foodborne pathogens and toxins. *Journal of Food Protection* 51, 498-508.
- Bryan, F.L. and Doyle, M.P. 1995. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *Journal of Food Protection* 58, 326-344.
- Byczkowski, J. and Gessner, T. 1998. Biological role of superoxide ion-radical. *International Journal of Biochemistry* 20, 569-580.
- Byrd, J.A. and McKee, S.R. 2005. Improving slaughter and processing technologies. In: *Food safety control in the poultry industry*. G.C. Mead (Ed.), Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, U.K., pp. 310-327.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. and Garcia-Fernandez, M.C. 2001. Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of

- a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology* 65, 75-82.
- Condon, S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews* 46, 269-280.
- Cotter, P., Hill, C. and Ross, P. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for foods. *Nature Reviews Microbiology* 3, 777–788.
- Cox, N.A., Richardson, L.J., Bailey, J.S., Cosby, D.E., Cason, J.A., Musgrove, M.T. and Mead, G.C. 2005. Bacterial contamination of poultry as a risk to human health. In: *Food safety control in the poultry industry*. G.C. Mead (Ed.), Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, U.K., pp. 21-35.
- Cramer, J.A. and Prestegard, J.H. 1977. NMR studies of pH-induced transport of carboxylic acids across phospholipid vesicle membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 75, 295-301.
- D' aoust, J.Y. 1989. *Salmonella*. In: *Foodborne Bacterial Pathogens*. M.P. Doyle (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 328-413.
- D'aoust, J.Y. and Maurer, J. 2007. *Salmonella* species. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. M.P. Doyle and L.R. Beuchat. 3rd edition. ASM Press, Washington, D.C., pp. 187-236.
- Dahiya, R.S. and Speck,, M.L. 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science* 70, 1-12.
- DeDonder, S., Jacob, C.J., Surgeoner, B.V., Chapman, B., Phebus, R. and Powell, D.A. 2009. Self-reported and observed behavior of primary meal preparers and adolescents during preparation of frozen, uncooked, breaded chicken products. *British Food Journal* 111(9), 915-929.

- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf life extension. *International Dairy Journal* 16, 1058-1071.
- Dixon, N.M. and Kell, D.B. 1989. A review. The inhibition of CO₂ of growth and metabolism of micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 67, 109-136.
- EFSA. 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *The EFSA Journal* 9(3), 1-378.
- Eijsink, V.G., Axelsson, L., Diep, D.B. Havarstein, L.S. Holo, H. and Nes, I.F. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 639-654.
- Fischer, A.R.H., De Jong, A.E.I., Van Asselt, E.D., De Jonge, R., Frewer, L.J. and Nauta, M.J. 2007. Food Safety in the Domestic Environment: An Interdisciplinary Investigation of Microbial Hazards During Food Preparation. *Risk Analysis* 27 (4), 1065-1082.
- Garbutt, J. 1997. *Essentials of Food Microbiology*. Arnold, London, U.K, pp. 106
- Garneau, S., Martin, N. and Vederas, J.C. 2002. Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84, 577-592.
- Genigeorgis, C. 1985. Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. *International Journal of Food Microbiology* 1, 237-251.
- Genigeorgis, C., Oanca, P. and Dutulescu, D. 1990. Prevalence of *Listeria* spp. in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. *Journal of Food Protection* 53, 282-288

- Genigeorgis, C. 1995. Sanitation of biofilms. ECCEAMST course. In: Production of Processed Meats and Convenience Foods. Building a predictable safety 25-28 June 1995. Athens Greece.
- Gilmore, M.S., Segarra, R.A. and Booth, M.C. 1990. An HlyB-type function is required for expression of the *Enterococcus faecalis* hemolysin / bacteriocin. Infection and Immunity 58, 3914-3923.
- Granly Koch, A. 2004. Biopreservation. In *Encyclopedia of Meat Sciences*. Editor-in-Chief: Werner Klinth Jensen. pp 68-74. Elsevier Ltd.
- Grau, F.H. 1986. Microbial ecology of meat and poultry. In: Advances in Meat Research. A.M. Pearson and T.R. Dutson (eds.). Vol. 2. Meat and Poultry Microbiology. AVI Publ. Co., Westport. CT., pp. 1-47.
- Griffith, C.J. and Redmond, E.C. 2005. Handling poultry and eggs in the kitchen. In: Food safety control in the poultry industry. G.C. Mead (Ed.), Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, U.K., pp. 524-543.
- Holzapfel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. International Journal of Food Microbiology 24, 343-362.
- Hotchkiss, I.H., Baker, R.C. and Qureshi, R.A. 1985. Elevated carbon dioxide atmospheres for packaging poultry. Effects of chicken quarters and bulk packages. Poultry Science 64, 333-340
- Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Applied and Environmental Microbiology 44, 525-532.
- Jay, J.M. 1996. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. Food Control 7, 209-214.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology. 7th edition. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA, pp. 322, 326-327, 619-636.

- Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R. 1986. Characterization of purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology* 167, 439-446.
- Johnson, J.L., Phelps, C.F., Cummins, C.S., London, J. and Gasser, F. 1980. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30, 53-68.
- Juven, B.J. and Pierson, M.D. 1996. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *Journal of Food Protection* 59(11), 1233-1241.
- King, A.D.Jr. and Nagel, C.W. 1975. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Food Science* 40, 362-366.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 39-86.
- Klaenhammer, T.R. Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A. and Altermann, E. 2005 Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 393-409.
- Klaenhammer, T.R. 2007. Probiotics and Prebiotics In: "Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers". M.P. Doyle and L.R. Beuchat, (eds). 3rd Ed. ASM Press. Washington D.C., pp. 891-907
- Korkeala, H., Rahkio, M., Ridell, J. and Makela P. 1991. Effect of carbon dioxide packaging on ropiness observed in meat products. *Proceedings of 37th International Congress of Meat Science and Technology* 2, 4:12, 571-574.
- Kullen, M.J., Brady, L.J. and O'Sullivan, D.J. 1997. Evaluation of using a short region of the *recA* gene for rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters* 154, 377-383.

- Kullen, M.J., Sanozky-Dawes, R.B., Crowel, D.C. and Klaenhammer T.R. 2000. Use of DNA sequence of variable regions of the 16s rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactococcus acidophilus* complex. *Journal of Applied Microbiology* 89, 511-518.
- Κοϊδης, Π.Α. 2003. Υγιεινή του κρέατος των πουλερικών. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Θεσσαλονίκη
- Lauer, E., Helming, C. and Kandler, O. 1980. Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. *Zentbl. Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene 1. Abteilung Originalarbeiten* C1, 150-168.
- Le Minor, L. and Popoff, M.Y. 1987. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. Nov., nom. Rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 465-468.
- Lillard, H.S. 1989. Factors affecting the persistence of *Salmonella* during the processing of poultry. *Journal of Food Protection* 52 : 829-832.
- Lindgren, P.E. and Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews* 87, 149-163.
- Maragkoudakis, P. E. Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D. and Tsakalidou, E. 2009. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology* 130, 219-226.
- May, K.N. 1974. Changes in microbial numbers during final washing and chilling of commercially slaughtered broilers. *Poultry Science* 53, 1282-1285.
- Mead, G.C. 1989. *Processing of poultry*. Elsevier Applied Sci. London, N. York.

- Mead, G.C. 2005. Food safety control in the poultry industry. CRC Press, New York.
- Montville, T.J. and Chikindas, M.L. 2007. Biopreservation of Foods. In: "*Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*". M.P., Doyle and L.R., Beuchat, (eds). 3rd Ed. ASM Press. Washington D.C., pp. 747-764.
- Mulder, R.W.A. 1996. Impact of Transport and Related Stressed on the Incidence and Extend of Human Pathogens in Pigmeat and Poultry. In: HACCP : An Integrated Approach to Assuring the Microbiological Safety of Meat and Poultry. Eds. J.J. Sheridan et all. Food & Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut 06611, USA.
- N.A.C.M.C.F. (The National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods) 1995. *Campylobacter jejuni/coli*. Dairy, Food Environ. Sanit. 15, 133-153.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S. Brurberg, M.B., Eijsink, V., and Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. A. v. Leeuwenhoek 70, 113-128.
- Nilson, T. 1999. Novel enterococcal bacteriocins; optimization of production, purification, biochemical and genetic characterization. PhD Thesis. Agricultural University of Norway. As, Norway.
- O'Sullivan, D.J. 1999. Methods for the analysis of the intestinal microflora. In: *Probiotics: a Critical Review*, G.W. Tannock (ed.). Horizon Scientific Press, Norwich, United Kingdom, pp. 23-44.
- Ojeniyi, B., Wegener, H.C., Jensen, N.E. and Bisgaard, M. 1996. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. Journal of Applied Bacteriology 80, 395-401.
- Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: "Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects". S.

- Salminen and A. von Wright (eds.). Marcel Dekker, New York, pp. 139-159.
- Papagianni, M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances* 21, 465-499.
- Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., and Lo Nostro, A. 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control* 21, 708-713.
- Piard, J.C., Muriana, P.M., Desmazeaud, M.J. and Klaenhammer, T.R. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 279-284.
- Praakle-Amin, K., Hanninen, M.L. and Korkeala, H. 2006. Prevalence and genetic characterization of *Listeria monocytogenes* in retail broiler meat in Estonia. *Journal of Food Protection* 69, 436-440.
- Price, R.J. and Lee, J.S. 1970. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *Journal of Milk and Food Technology* 33, 13.
- Πανούλης, Χ., Αμπραχίμ, Α., Θεοδωρίδης, Α., Γενηγιώργης, Κ. και Καραϊωάνογλου, Π. 1990. Διερεύνηση της παρουσίας των *Listeria* spp. σε σφάγια πτηνών κατά τα διάφορα στάδια της προετοιμασίας τους καθώς και σε έτοιμα σφάγια του εμπορίου. 5^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 22-25 Νοεμβρίου 1990, Περίληψη Πρακτικών Συνεδρίου σελ. 236-237.
- Παπά, Α. Κανσουζίδου, Α., Καραμπαξόγλου, Δ. και Δανιηλίδης Β.Δ. 1994. Διασπορά της λιστέριας σε κοτόπουλα που καταναλώνονται σε Νοσοκομεία της Θεσσαλονίκης. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 39, 536-542.

- Παπά Α. 1996. Συμβολή στη μελέτη της διασποράς των λιστεριών. Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα, σελ. 116, 138-139, 160.
- Ray, B. and Bhunia, A. 2008. *Fundamental Food Microbiology*. 4th edition. CRC Press, Florida, USA, 175-187.
- Reeves, M.W., Evins, G.M., Heiba, A.A. Plikaytis, B.D. and Farmer, J.J. 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 313-320.
- Ryan, M.P., Jack, R.W., Josten, M., Sahl, H.G., Jung, G., Ross, R.P. and Hill, C. 1999. Extensive post-translational modification, including a serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lactacin 3147. *Journal of Biological Chemistry* 274, 37544-37550.
- Sahl, H.G. and Bierbaum, G. 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology* 52, 41-79.
- Sahl, H.G., Jack, R.W. and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry* 230, 827-853.
- Salminen, S., Laine, M., von Wright, A., Vuopio-Varkila, J., Korhonen, T. and Matilla-Sandholm, T. 1996. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: A Nordic and European approach. *Bioscience and Microflora* 15, 61-67.
- Sarlin, L.L., Barnhart, E.T., Caldwell, D.J., Moore, R.W., Byrd, J.A., Caldwell, D.Y., Corrier, D.E., Deloach, J.R., and Hargis B.M. 1998. Evaluation of Alternative Sampling Methods for *Salmonella* Critical Control Point Determination at Broiler Processing. *Poultry Science* 77, 1253-1257.

- Seeliger, H.P.R. and Jones, D. 1986. Genus *Listeria*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1235-1245.
- Simonsen, B. 1989. Microbiological criteria for poultry products. In: *Processing of Poultry*. G.C. Mead (Ed) Elsevier Applied Sci. London, N. York pp. 221-250.
- Swaminathan, B., Cabanes, D., Zhang, W. and Cossart P. 2007. *Listeria Monocytogenes*. In: "*Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*". M.P., Doyle and L.R., Beuchat, (Eds). 3rd Ed. ASM Press. Washington D.C., pp. 457-491.
- Tagg, J.R. Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews* 40, 722-756.
- Tannock, G.W. 1999. A fresh look at the intestinal microflora. In: *Probiotics: a Critical Review*, G.W. Tannock (ed.). Horizon Scientific Press, Norwich, United Kingdom, pp. 5-14.
- Thomas, C.J., Mc Meekin, A. 1980. Contamination of broiler cartas skin during commercial processing procedures: an electron microscopic study. *Applied and Environmental Microbiology* 40 : 133-144.
- Thomas, L.V., Clarkson, M.R. and Delves-Broughton, J. 2000. In: *Natural food antimicrobial systems*. CRC Press, A.S. Naidu, USA, pp. 463-524.
- Tinker, D.B. και Burton, C.H. Catching, transporting and lairage of live poultry. In: *Food safety control in the poultry industry*. G.C. Mead (Ed.), Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, U.K., pp. 153-173.
- Varnam, A.H., Satterland, J.P. 1995. *Meat and Meat Products, Technology, Chemistry and Microbiology*. Chapman and Hall London, N. York.
- Villegas E. and Gilliland, S.E. 1998. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* at 5°C. *Journal of Food Science* 63, 1070-1074.

- Vitas, A.I., Aguado, V. and Garcia-Jalon, I. 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 90, 349-356.
- Wagner, M. and McLauchlin, J. 2008. Biology. In: *Handbook of Listeria monocytogenes*. D. Liu (Ed.). CRC Press, USA, pp. 1-25.
- World Health Organization 1988. Report of the informal working group on foodborne listeriosis. *Bull WHO* 66, 421-428.
- World Health Organization 1989. Report of WHO Consultation on Epidemiological Emergency in Poultry and Egg Salmonellosis. Geneva, 20-23 March 1989.
- Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D.L. and de Vos, W.M. 1998 Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals sand host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3854-3859.
- Zourari, A., Accolas, J.P. and Desmazeaud, M.J. 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *Lait* 72, 1-34.

Κεφάλαιο 2^ο

**Διερεύνηση της
παρουσίας και της
αντιμικροβιακής
αντοχής στελεχών
Salmonella spp. που
απομονώθηκαν από
σφάγια ορνιθίων
στη Β. Ελλάδα**

2.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η έρευνα αυτή περιλαμβάνει τη διερεύνηση της παρουσίας και της αντιμικροβιακής ευαισθησίας των οροτύπων *Salmonella* spp. σε σφάγια ορνιθίων κρεοπαραγωγής από τέσσερα πτηνοσφαγεία της Β. Ελλάδας. Εξετάστηκαν συνολικά 150 δείγματα δέρματος τραχήλου που προέρχονταν από 450 σφάγια ορνιθίων και 40 δείγματα επιφανειών, προερχόμενα από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων.

Στελέχη *Salmonella* spp. βρέθηκαν σε 56 (37%) από τα 150 δείγματα που εξετάστηκαν. Όσον αφορά τη μόλυνση του περιβάλλοντος των πτηνοσφαγείων, τρία δείγματα επιφανειών, από τα 40 που εξετάστηκαν συνολικά και στα τέσσερα πτηνοσφαγεία, βρέθηκαν μολυσμένα με *Salmonella* spp., τα οποία και προέρχονταν από ένα μόνο πτηνοσφαγείο. Συνολικά απομονώθηκαν 142 στελέχη τα οποία ταυτοποιήθηκαν σε έξι διαφορετικούς ορότυπους. Ο ορότυπος που απομονώθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα ήταν ο *S. Blockley* (73,2%), και ακολουθούσαν κατά φθίνουσα σειρά οι *S. Paratyphi B* (16,9%), *S. Bredeney* (6,3%), *S. Neftenbach* (1,4%), *S. Hadar* (1,4%) και *S. Thompson* (0,7%).

Πενήντα εννέα στελέχη *Salmonella* spp. (ένα στέλεχος από κάθε θετικό δείγμα συμπεριλαμβάνοντας και τα δείγματα από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων) ελέγχθηκαν επίσης για την ευαισθησία τους σε είκοσι αντιμικροβιακούς παράγοντες με τη μέθοδο της διάχυσης των δίσκων. Όλα τα στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά σε 4 αντιβιοτικά (πενικιλίνη, ερυθρομυκίνη, βανκομυκίνη και κλινδαμυκίνη). Υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν επίσης στην τετρακυκλίνη, στην οξυτετρακυκλίνη, στο οξολινικό οξύ, στο ναλιδιξικό οξύ, στην στρεπτομυκίνη, στη χλωραμφαινικόλη, στη νεομυκίνη και στην καναμυκίνη.

Τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν ένα σημαντικό ποσοστό μόλυνσης των σφαγίων ορνιθίων με *Salmonella* spp. και ένα υψηλό ποσοστό παρουσίας ανθεκτικών στελεχών σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

2.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κατανάλωση του ορνίθιου κρέατος και των προϊόντων του έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια, σε σχέση με τα άλλα είδη κρέατος, και έχει κερδίσει την προτίμηση των καταναλωτών χάρη στην υψηλή διαιτητική αξία του και τη χαμηλή τιμή του. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα σφάγια των ορνιθίων έχουν βρεθεί συχνά μολυσμένα με παθογόνα βακτήρια, όπως η *Salmonella* spp..

Το ορνίθιο κρέας έχει κατηγορηθεί ότι είναι ένα από τα τρόφιμα που εμπλέκονται συχνότερα στις τροφοδηλητηριάσεις που προκαλούνται από τις *Salmonella* spp.. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί σε μια σειρά παραγόντων όπως η εντατική εκτροφή των ορνιθίων, η πιθανότητα μόλυνσης κατά τη διάρκεια της σφαγής και η ανεπαρκής εφαρμογή των κανόνων ορθής υγιεινής κατά την προετοιμασία των προϊόντων από ορνίθιο κρέας (Doyle και Beuchat, 2007; Jay και συν., 2005; Ray και Bhunia, 2008).

Η παρουσία των *Salmonella* spp. στο ορνίθιο κρέας έχει διερευνηθεί σε πολλές χώρες, όπως η Ισπανία (Dominguez και συν., 2002), η Πορτογαλία (Antunes και συν., 2003), το Βέλγιο (Uyttendaele και συν., 1998) η Ελλάδα (Arvanitidou και συν., 1998) και τα επίπεδα της μόλυνσης βρέθηκαν 35,83%, 60%, 36,7% και 69% αντιστοίχως.

Πολλά ομαδικά κρούσματα αλλά και μεμονωμένες περιπτώσεις Σαλμονέλωσης συμβαίνουν παγκοσμίως. Στην Ελλάδα τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η σαλμονέλωση αποτελεί την πιο συχνά καταγεγραμμένη αιτία τροφικής δηλητηρίασης. Ο ορότυπος *Salmonella* spp. που απομονώνεται συχνότερα είναι ο *S. Enteritidis*, ακολουθούμενος από τον *S. Typhimurium* (EFSA, 2009; Schmidt και Tirado, 2001; Schmidt και Gervelmeyer, 2003).

Τα τελευταία χρόνια, η εμφάνιση στελεχών *Salmonella* spp. ανθεκτικών στα αντιβιοτικά, η οποία οδήγησε σε αποτυχίες στη θεραπεία της Σαλμονέλωσης σε ανθρώπους, σε συνδυασμό με την παθογένεια της, έχει προκαλέσει ιδιαίτερη ανησυχία παγκοσμίως (Busani και συν., 2004;

Padungtod και Kaneene, 2006). Η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών στην καθημερινή κτηνιατρική και ιατρική πράξη έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση ανθεκτικών βακτηρίων, στα οποία περιλαμβάνεται και οι *Salmonella* spp.. Στα παραγωγικά ζώα και ιδιαίτερα στα κοτόπουλα, τα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς εξυπηρετώντας διάφορους σκοπούς, όπως είναι η βελτίωση των αποδόσεων της ανάπτυξης, η προφύλαξη αλλά και η θεραπεία νοσημάτων. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην έκθεση ενός μεγάλου αριθμού ζώων σε υποθεραπευτικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών (Dupont και Steele, 1987; Franco και συν., 1990) και προκάλεσε την δημιουργία μιας δεξαμενής με αντιβιοτικόάντοχα βακτήρια (Endtz και συν., 1991; Smith και συν., 1999). Επομένως, η αλόγιστη και μη ορθολογική χρήση αντιβιοτικών είχε ως συνέπεια την επιλογή και επικράτηση οροτύπων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά και τη μείωση της αποτελεσματικότητας τους έναντι των βακτηριακών λοιμώξεων.

Η ανάπτυξη της αντιμικροβιακής αντοχής των βακτηρίων προκαλείται από διάφορους μηχανισμούς όπως: (i) αλλαγές στη διαπερατότητα της βακτηριακού τοιχώματος, (ii) ενεργειακά εξαρτώμενη απομάκρυνση των αντιβιοτικών διαμέσου των αντλιών εκροής της μεμβράνης (iii) τροποποίηση του χώρου δράσης του φαρμάκου και (iv) καταστροφή ή αδρανοποίηση των αντιβιοτικών (Barbosa και Levy, 2000; Schwarz και Chaslus-Dancla, 2001). Επιπρόσθετοι αντιμικροβιακοί φαινότυποι αναπτύσσονται συχνά μέσω συζευγμένης μεταφοράς πλασμιδίων (Fey και συν., 2000; Gebreyes και Altier, 2002; Guerra και συν., 2002).

Οι στόχοι αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί ο επιπολασμός των *Salmonella* spp. στα σφάγια των ορνιθίων στη Β. Ελλάδα και να αξιολογηθεί η αντιμικροβιακή αντίσταση των στελεχών της.

2.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1 Δειγματοληψία

Τέσσερα διαφορετικά πτηνοσφαγεία της Β. Ελλάδας (τα οποία θα αναφέρονται ως πτηνοσφαγείο 1, 2, 3, 4) επιλέχθηκαν για τη διενέργεια της παρούσας μελέτης. Το ένα από αυτά (πτηνοσφαγείο 3) ήταν σύγχρονο με εξοπλισμό τελευταίας τεχνολογίας, ενώ τα υπόλοιπα τρία (πτηνοσφαγείο 1, 2, 4) ήταν παραδοσιακού τύπου, καλύπτοντας ωστόσο όλες τις ισχύουσες νομοθετικές απαιτήσεις.

Τα δείγματα ήταν τεμάχια δέρματος τραχήλου που λαμβάνονταν από σφάγια ορνιθίων αμέσως μετά τη σφαγή τους (ISO 17604:2003). Η περιοχή του τραχήλου θεωρείται ότι είναι περισσότερο επιβαρυνμένη από μικροβιολογικής απόψεως, λόγω του τρόπου ανάρτησης των σφαγίων κατά τη διαδικασία της σφαγής (Colin και Corry, 1999).

Ένα τεμάχιο βάρους 10 g περίπου δέρματος τραχήλου λαμβάνονταν από κάθε σφάγιο. Τα τεμάχια δέρματος από τρία σφάγια ομογενοποιούνταν πριν την εξέταση προκειμένου να σχηματίσουν το τελικό δείγμα των 25 g (ISO 17604:2003). Εξετάστηκαν συνολικά 150 δείγματα (450 σφάγια) για την παρουσία ή απουσία *Salmonella* spp.

Επιπλέον, 40 δείγματα ελήφθησαν από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων με τη μέθοδο των βυσμάτων. Τα σημεία δειγματοληψίας περιελάμβαναν επιφάνεια: α) 8 πάγκων επεξεργασίας των σφαγίων αμέσως μετά την ψύξη τους, β) 8 άδειων πλαστικών περιεκτών, γ) 8 γεμάτων με σφάγια πλαστικών περιεκτών, δ) 8 χειρολαβών των ψυγείων και ε) 8 πάγκων κοπής των φιλέτων. Η απόμαξη αφορούσε 100 cm² επίπεδης επιφάνειας και ολόκληρες τις λαβές των ψυγείων και επαναλαμβάνονταν 2-5 φορές με τη χρήση αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στείλιου. Πριν από την απόμαξη, τα βύσματα υγραίνονταν σε ζωμό Half Fraser και στη συνέχεια, μεταφέρονταν σε φιαλίδια που περιείχαν 10 ml του ίδιου υποστρώματος. Ακολουθούσε

απόμαξη της ίδιας επιφάνειας με στεγνό βύσμα, το οποίο μεταφέρονταν στο ίδιο φιαλίδιο. Οι 2-5 απομάξεις σχημάτιζαν ένα δείγμα.

Τα δείγματα μεταφέρονταν εντός μίας ώρας στο εργαστήριο μέσα σε ισοθερμικούς περιέκτες με πάγο και εξετάζονταν άμεσα.

2.3.2 Απομόνωση των *Salmonella* spp.

Η απομόνωση των *Salmonella* spp. γινόταν με τη μέθοδο που καθορίζει η Διεθνής Σταθερά EN/ISO 6579:2002, με μια μικρή τροποποίηση που αφορούσε τη φάση του εκλεκτικού εμπλουτισμού. Πιο συγκεκριμένα, 25 g δέρματος τραχήλου ομογενοποιούνταν με 225 ml Buffered Peptone Water σε συσκευή Stomacher (Stomacher 400 – laboratory blender, Seward Medical, London, UK) για 2 λεπτά. Οι βαμβακοφόροι στείλεοί εμβαπτιζόνταν απευθείας σε 10 ml προεμπλουτιστικού ζωμού Buffered Peptone Water. Μετά από επώαση 18-20 ωρών σε θερμοκρασία 37°C μεταφερόταν 0,1 ml και 1 ml της προεμπλουτιστικής καλλιέργειας σε 10 ml Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone broth και σε 10 ml Selenite-Cystine broth, αντίστοιχως. Οι δύο εκλεκτικοί εμπλουτιστικοί ζωμοί επωάζονταν ο μιν πρώτος σε θερμοκρασία 42°C, ο δε δεύτερος σε θερμοκρασία 37°C επί 24 ώρες και στη συνέχεια γινόταν ενοφθαλμισμός στα εκλεκτικά υποστρώματα Xylose Lysine Decarboxylase agar (XLD) και Bismuth Sulfite agar (BSA). Τα υποστρώματα αυτά μετά τον ενοφθαλμισμό τους επωάζονταν σε θερμοκρασία 37°C επί 24 ώρες. Έως 5 χαρακτηριστικές αποικίες, οι οποίες αναπτύσσονταν στα προαναφερθέντα εκλεκτικά υποστρώματα, μετά την καθαροποίηση τους σε Nutrient agar (24h, 37°C) υποβάλλονταν σε έλεγχο των εξής βιοχημικών τους ιδιοτήτων: ζύμωση γλυκόζης (TSI agar), παραγωγή ουρεάσης (urea broth), αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης (LI agar), ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης (ζωμός ONPG), αντίδραση Voges-Proskauer και αντίδραση της ινδόλης (tryptone water). Ακολουθούσε ορολογικός έλεγχος με πολυδύναμους και μονοδύναμους αντιορούς.

Όλα τα υποστρώματα και οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από τη Merck KGaA (Darmstadt, Germany) εκτός και αν επισημαίνεται διαφορετικά.

2.3.3 Ορολογική τυποποίηση των *Salmonella* spp.

Η ορολογική τυποποίηση των απομονωμένων στελεχών πραγματοποιούνταν στο Κέντρο Αναφοράς Σαλμονέλας Μακεδονίας και Θράκης και στο Εθνικό Κτηνιατρικό Εργαστήριο Αναφοράς της Σαλμονέλας στη Χαλκίδα.

2.3.4 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των *Salmonella* spp.

Πενήντα εννέα στελέχη *Salmonella* spp. (ένα στέλεχος από κάθε θετικό δείγμα συμπεριλαμβάνοντας και τα δείγματα από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων) ελέγχθηκαν για την ευαισθησία τους σε μια ομάδα 20 αντιμικροβιακών παραγόντων. Οι φαινότυποι αντιμικροβιακής ευαισθησίας των στελεχών καθορίστηκαν με τη μέθοδο της διάχυσης των δίσκων σε τρυβλία Mueller-Hinton agar, σύμφωνα με τις οδηγίες του Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; πρώην NCCLS) (NCCLS, 2004). Τα αντιβιοτικά δισκία (BBL) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν (συγκέντρωση σε μικρογραμμάρια ανά δισκίο): αμοξικιλίνη (25 µg), αμπικιλίνη (10 µg), κεφοταξίμη (30 µg), κεφαλοτίνη (30 µg), χλωραμφαινικόλη (30 µg), σιπροφλοξακίνη (5 µg), κλινδαμυκίνη (2 µg), ενροφλοξακίνη (5 µg), ερυθρομυκίνη (15 µg), γενταμικίνη (10 µg), καναμυκίνη (30 µg), ναλιδιξικό οξύ (30 µg), νεομυκίνη (30 µg), οξολινικό οξύ (2 µg), οξυτετρακυκλίνη (30 µg), πενικιλίνη (10 U), στρεπτομυκίνη (10 µg), σουλφομεθοξαζόλη και τριμεθοπρίμη (23,75/1,25 µg), τετρακυκλίνη (30 µg) και βανκομυκίνη (30 µg). Τα στελέχη *E. coli* ATCC 25922 και *S. aureus* ATCC 29213 χρησιμοποιήθηκαν ως στελέχη αναφοράς για την παρούσα έρευνα.

2.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.4.1 Παρουσία των *Salmonella* spp. στα σφάγια ορνιθίων και στο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων

Salmonella spp. απομονώθηκαν σε 56 (37%) από τα 150 δείγματα δέρματος τραχήλου που εξετάστηκαν (Πίνακας 2.1). Ο επιπολασμός τους κυμάνθηκε από 12% (Πτηνοσφαγείο 3) έως 80% (Πτηνοσφαγείο 2). Αναλυτικά τα αποτελέσματα που αφορούν την παρουσία των *Salmonella* spp. σε σφάγια ορνιθίων που προέρχονταν από τα τέσσερα πτηνοσφαγεία της κεντρικής Μακεδονίας δίνονται στον πίνακα 2.1

Πίνακας 2.1: Αποτελέσματα της παρουσίας των *Salmonella* spp. σε σφάγια ορνιθίων.

Πτηνοσφαγείο	Αριθμός θετικών δειγμάτων / Σύνολο δειγμάτων (3 σφάγια /δείγμα)	Ποσοστό θετικών δειγμάτων <i>Salmonella</i> spp.
1	17 / 75	23%
2	20 / 25	80%
3	3 / 25	12%
4	16 / 25	64%
Σύνολο	56 / 150	37%

Salmonella spp. απομονώθηκαν και από το περιβάλλον του πτηνοσφαγείου 2. Τα αναλυτικά αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Αποτελέσματα της παρουσίας των *Salmonella* spp. στο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων.

	Χειρολαβές ψυγείων		Περιέκτες με σφάγια		Κενοί περιέκτες		Επιφάνεια επεξεργασίας		Επιφάνεια φιλετοποίησης	
	Δ 1*	Δ 2*	Δ 1	Δ 2	Δ 1	Δ 2	Δ 1	Δ 2	Δ 1	Δ 2
Πτηνοσφαγείο 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Πτηνοσφαγείο 2	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Πτηνοσφαγείο 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Πτηνοσφαγείο 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

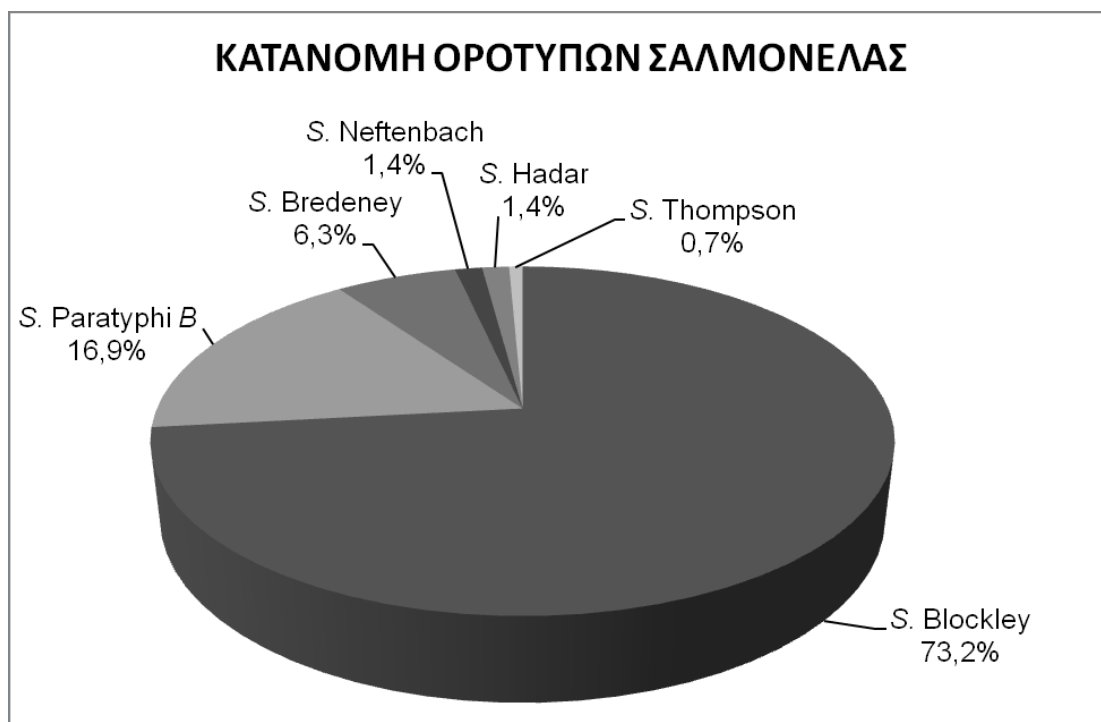
- : απουσία *Salmonella* spp., + : παρουσία *Salmonella* spp.

Δ 1*: Δείγμα 1, Δ 2*: Δείγμα 2

2.4.2 Κατανομή των οροτύπων *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από τα σφάγια των ορνιθίων

Συνολικά απομονώθηκαν 142 στελέχη τα οποία ανήκαν σε έξι διαφορετικούς ορότυπους. Πρώτος σε συχνότητα απομόνωσης ήταν ο *S. Blockley* (73,2%), ακολουθούσε ο *S. Paratyphi B* (16,9%) και σε πολύ μικρό ποσοστό οι ορότυποι *S. Bredeney* (6,3%), *S. Neftenbach* (1,4%), *S. Hadar* (1,4%) και *S. Thompson* (0,7%). Η κατανομή των οροτύπων των εξετασθέντων στελεχών *Salmonella* spp. φαίνεται στο γράφημα 2.1.

Γράφημα 2.1: Κατανομή των οροτύπων *Salmonella* spp.



2.4.3 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από τα σφάγια των ορνιθίων και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων

Ο έλεγχος ευαισθησίας 59 στελεχών (ένα στέλεχος από κάθε θετικό δείγμα συμπεριλαμβάνοντας και τα δείγματα από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων) έναντι μιας ομάδας 20 αντιμικροβιακών παραγόντων ελέγχθηκε επίσης στην παρούσα έρευνα. Όλα τα απομονωθέντα στελέχη ήταν ανθεκτικά σε τουλάχιστον 4 από τους χρησιμοποιηθέντες αντιμικροβιακούς παράγοντες. Ο ορότυπος *S. Blockley* βρέθηκε ανθεκτικός έναντι 12 αντιμικροβιακών παραγόντων, ο *S. Paratyphi B* έναντι 8, ο *S. Hadar* έναντι 9, ο *S. Neftenbach* έναντι 13, ο *S. Bredeney* έναντι 11 και ο *S. Thompson* έναντι 5. Τα αποτελέσματα του ελέγχου της ευαισθησίας των εξετασθέντων στελεχών *Salmonella* spp. έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 2.3. Όλα τα στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά στην πενικιλίνη, ερυθρομυκίνη, βανκομυκίνη και κλινδαμυκίνη, ενώ υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν και στην τετρακυκλίνη (88%),

οξυτετρακυκλίνη (88%), οξολινικό οξύ (88%), ναλιδιξικό οξύ (88%), στρεπτομυκίνη (83%), χλωραμφαινικόλη (80%), νεομυκίνη (76%) και καναμυκίνη (76%). Λιγότερα στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη και στη σουλφομεθοξαζόλη + τριμεθοπρίμη. Η γενταμικίνη, η κεφοταξίμη, η κεφαλοτίνη, η σιπροφλοξακίνη και η ενροφλοξακίνη ήταν οι μόνοι αντιμικροβιακοί παράγοντες που ήταν αποτελεσματικοί έναντι όλων των στελεχών *Salmonella* spp. που εξετάστηκαν (Πίνακας 2.3).

Πίνακας 2.3: Αποτελέσματα του ελέγχου ευαισθησίας των στελεχών *Salmonella* spp. σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Αντιμικροβιακός παράγοντας	Ανθεκτικά στελέχη						Στελέχη ενδιαμέσης ανθεκτικότητας	
	S. Blockley (42)	S. Paratyphi B (8)	S. Bredeney (4)	S. Hadar (2)	S. Neftenbach (2)	S. Thompson (1)	Σύνολο	
κλινδαμυκίνη (2 µg)	42	8	4	2	2	1	59 (100%)	-
ερυθρομυκίνη (15 µg)	42	8	4	2	2	1	59 (100%)	-
πενικιλίνη (10 U)	42	8	4	2	2	1	59 (100%)	-
βανκομυκίνη (30 µg)	42	8	4	2	2	1	59 (100%)	-
οξυτετρακυκλίνη (30 µg)	42	2	4	2	2	-	52 (88%)	7 (12%)
τετρακυκλίνη (30 µg)	42	2	4	2	2	-	52 (88%)	4 (7%)
ναλιδιξικό οξύ (30 µg)	42	8	-	2	-	-	52 (88%)	-
οξολινικό οξύ (2 µg)	42	8	-	2	-	-	52 (88%)	-
στρεπτομυκίνη (10 µg)	42	-	3	2	2	-	49 (83%)	8 (13%)
χλωραμφαινικόλη (30µg)	42	-	3	-	2	-	47 (80%)	-
καναμυκίνη (30 µg)	42	-	1	-	2	-	45 (76%)	-
νεομυκίνη (30 µg)	42	-	1	-	2	-	45 (76%)	-
αμοξικιλίνη (25 µg)	-	-	3	-	2	-	5 (8%)	-
αμπικιλίνη (10 µg)	-	-	3	-	2	-	5 (8%)	-
σουλφομεθοξαζόλη + τριμεθοπρίμη (23,75/1,25 µg)	-	-	3	-	2	-	5 (8%)	-
κεφοταξίμη (30 µg)	-	-	-	-	-	-	0	-
κεφαλοτίνη (30 µg)	-	-	-	-	-	-	0	-
σιπροφλοξακίνη (5 µg)	-	-	-	-	-	-	0	-
ενροφλοξακίνη (5 µg)	-	-	-	-	-	-	0	-
γενταμικίνη (10 µg)	-	-	-	-	-	-	0	-

2.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.5.1 Παρουσία των *Salmonella* spp. στα σφάγια ορνιθίων και στο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων

Η παρουσία των *Salmonella* spp. στα ορνίθια κρεοπαραγωγής και στα προϊόντα τους κυμαίνεται, σε έρευνες που έχουν γίνει σε διάφορες χώρες, από 1,5% στη βόρεια Ιρλανδία (Soultos και συν., 2003) έως 60% στην Πορτογαλία (Antunes και συν., 2003). Σε σύγκριση με τα στοιχεία της κοινοτικής έκθεσης του 2007 για τις ζωνόσους που αφορά σφάγια ορνιθίων, όπου ο επιπολασμός των *Salmonella* spp. στα πτηνοσφαγεία μεταξύ των κρατών μελών κυμάνθηκε από <0,1% έως 21,5% για το 2005 και από 0,02% έως 15,1% για το 2006 (EFSA, 2009), ο επιπολασμός των *Salmonella* spp. που βρέθηκαν στη δική μας μελέτη ήταν συγκριτικά μεγαλύτερος. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται σε μια σειρά παραγόντων όπως είναι η χρονική περίοδος της δειγματοληψίας και η ηλικία των ορνιθίων που εξετάζονταν, η διαφορετική προέλευση των πτηνών, η επιλογή διαφορετικού δείγματος και μεθόδου δειγματοληψίας, το επίπεδο μόλυνσης των πτηνών, η αποτελεσματικότητα του προγράμματος καθαριότητας του πτηνοσφαγείου, το στάδιο της επεξεργασίας και της διασταυρούμενης επιμόλυνσης των προϊόντων, το μέγεθος του δείγματος και η επιλεγμένη μέθοδος απομόνωσης των *Salmonella* spp. (Bryan και Doyle, 1995; Parveen και συν., 2007; Uyttendaele και συν., 1999).

Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά την περίοδο της δειγματοληψίας της παρούσας έρευνας (2005-2006), ο επιπολασμός των *Salmonella* spp. στα σμήνη ορνιθίων κρεοπαραγωγής που κοινοποίησε η Ελλάδα σε έρευνα της Ευρωπαϊκής Ένωσης ήταν 27,3% (EFSA, 2009). Τα σμήνη των ορνιθίων που είναι μολυσμένα με *Salmonella* spp. συμβάλλουν στην επακόλουθη μόλυνση του ορνιθίου κρέατος. Είναι ωστόσο δυνατό και σμήνη απαλλαγμένα από *Salmonella* spp. να μολυνθούν κατά τη διαδικασία της σφαγής.

Οι διαφορές στο ποσοστό μόλυνσης μεταξύ των σφαγίων πουλερικών που προέρχονται από διαφορετικά πτηνοσφαγεία οφείλεται στις διαφορετικές

πρακτικές που εφαρμόζονται τόσο στα πτηνοσφαγεία όσο και στις πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις (Olah και συν., 2004). Όλα τα ορνίθια που εξετάστηκαν για την έρευνα μας προέρχονταν από πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις της ευρύτερης περιοχής της Κεντρικής Μακεδονίας. Το χαμηλό ποσοστό μόλυνσης (12%) που παρατηρήθηκε στο πτηνοσφαγείο 3 θα πρέπει να αποδοθεί στο γεγονός ότι διαθέτει τον πιο σύγχρονο εξοπλισμό από τα 4 της έρευνας μας, είναι το μόνο που διαθέτει σύστημα αερόψυξης και εφαρμόζει πιστοποιημένο σύστημα HACCP. Ένα σχεδόν διπλάσιο ποσοστό μόλυνσης (23%), αλλά χαμηλότερο από το μέσο όρο της έρευνας μας, παρατηρήθηκε στο πτηνοσφαγείο 1 το οποίο είναι λιγότερο σύγχρονο από πλευράς τεχνολογικού εξοπλισμού αλλά εφαρμόζει και αυτό σύστημα HACCP. Αντιθέτως, το ποσοστό μόλυνσης για τα σφάγια των πτηνοσφαγείων 2 και 4 ήταν σημαντικά υψηλότερο. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα δύο αυτά πτηνοσφαγεία δεν διαθέτουν σύγχρονο εξοπλισμό, δεν εφαρμόζουν σύστημα HACCP και, όπως και το πτηνοσφαγείο 1, διαθέτουν δεξαμενή ψυχρού νερού για την ψύξη των σφαγίων. Όπως αναφέρεται από τον Mead (2005), όταν οι ψυκτικές δεξαμενές λειτουργούν σωστά, τα βακτήρια που απαντώνται στην επιφάνεια των σφαγίων των ορνιθίων απομακρύνονται μηχανικά κατά ένα ποσοστό, γεγονός που συμβάλλει στη βελτίωση της μικροβιολογικής κατάστασης του σφαγίου. Αντιθέτως, οι κακοσυντηρημένες ψυκτικές δεξαμενές μπορεί να οδηγήσουν σε διασταυρούμενη μόλυνση των σφαγίων (Sarlin και συν., 1998) και προφανώς κάτι ανάλογο πιθανότατα συμβαίνει στα πτηνοσφαγεία 2 και 4. Επιπλέον, η εφαρμογή των Κανόνων Ορθής Υγιεινής και Βιομηχανικής Πρακτικής κατά τη διαδικασία του εκσπλαχνισμού είναι εξίσου σημαντική καθώς σύμφωνα με τους Sarlin και συν. (1998) η πλειοψηφία των διασταυρούμενων επιμολύνσεων των σφαγίων πριν την εμβάπτιση τους συμβαίνει κατά τη φάση του εκσπλαχνισμού, με τις ψυκτικές δεξαμενές να αποτελούν το δυνητικά πιο επικίνδυνο σημείο για την επιμόλυνση των σφηνών που είναι απαλλαγμένα από *Salmonella* spp. από αντίστοιχα μολυσμένα.

Στην Ελλάδα, οι έρευνες που έχουν γίνει όσον αφορά τον επιπολασμό των *Salmonella* spp. στα σφάγια ορνιθίων είναι σχετικά περιορισμένες. Μία

έρευνα που έγινε σε 3 βιομηχανικά πτηνοσφαγεία της ευρύτερης περιοχής της Θεσσαλονίκης κατά την περίοδο 1999-2000 έδειξε ότι στο 11% των ορνιθίων που προσήλθαν για σφαγή απομονώθηκε *Salmonella* spp. στο περιεχόμενο του τυφλού τους εντέρου. Μετά τη σφαγή, το ποσοστό των μολυσμένων ορνιθίων ανήλθε στο 33% (Alexandridou και συν., 2001). Το γεγονός αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι υπάρχει σοβαρό πρόβλημα μόλυνσης στα πτηνοσφαγεία, δεδομένου ότι είναι γνωστό ότι η τεχνολογία που εφαρμόζεται κατά την προετοιμασία των σφαγίων (δεξαμενή ζεματίσματος, μηχανή αποπτίλωσης, συσκευές αφαίρεσης σπλάχνων, δεξαμενή ψύξης) ευνοεί ιδιαίτερα τη μόλυνση τους με διάφορους μικροοργανισμούς, η οποία και πρέπει να αντιμετωπιστεί. Οι Karabaxoglou και συν. (1999) βρήκαν επίσης ότι το σύνολο σχεδόν των κοτόπουλων που εξετάστηκαν (97%) και προορίζονταν για κατανάλωση σε πέντε νοσοκομεία της Θεσσαλονίκης, ήταν μολυσμένα με *Salmonella* spp.. Σε άλλη έρευνα που έγινε από τους Arvanitidou και συν. (1998) απομονώθηκαν συνολικά 62 στελέχη *Salmonella* spp. στα 60 από τα 87 δείγματα κοτόπουλου που επιλέχθηκαν τυχαία από 20 διαφορετικές παρτίδες που προορίζονταν για τρία νοσοκομεία της Θεσσαλονίκης. Χαμηλότερα ποσοστά μόλυνσης (3%) με *Salmonella* spp. βρέθηκαν σε κατεψυγμένα κοτόπουλα εισαγωγής Γαλλίας, τα οποία προορίζονταν για νοσοκομείο της Θεσσαλονίκης (Arvanitidou και συν., 1998).

Όσον αφορά την παρουσία των *Salmonella* spp. στο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων βρέθηκε ότι το πτηνοσφαγείο 2 ήταν το μοναδικό που οι επιφάνειες του ήταν μολυσμένες με *Salmonella* spp. Από τα 40 δείγματα που εξετάστηκαν συνολικά και προέρχονταν από τα τέσσερα πτηνοσφαγεία, μόνο 3 δείγματα του πτηνοσφαγείου 2 βρέθηκαν μολυσμένα. Το βακτήριο απομονώθηκε από το ένα εκ των δειγμάτων που αφορούσαν τους πλαστικούς περιέκτες που χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση των σφαγίων στο ψυγείο ενώ περιείχαν σφάγια και από τα δύο δείγματα που αφορούσαν τους πάγκους κοπής των φιλέτων. Το συγκεκριμένο πτηνοσφαγείο ήταν αυτό με το μεγαλύτερο ποσοστό μόλυνσης με *Salmonella* spp. (80%) στα σφάγια. Προφανώς ο υψηλός επιπολασμός των *Salmonella* spp. στα σφάγια του συγκεκριμένου πτηνοσφαγείου οδήγησε στην επιμόλυνση κάποιων

επιφανειών του πτηνοσφαγείου που έρχονταν σε άμεση επαφή με τα σφάγια. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει και από το γεγονός ότι ο ορότυπος των *Salmonella* spp. των δειγμάτων των επιφανειών ήταν ταυτόσημος με τον ορότυπο που απομονώθηκε από τα σφάγια του ίδιου πτηνοσφαγείου (*S. Blockley*). Σε αντίστοιχες έρευνες που έχουν γίνει σε άλλες χώρες, τα ποσοστά απομόνωσης των *Salmonella* spp. από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων ήταν επίσης χαμηλά (10-16,7%) (Reiter και συν., 2007). Εξάλλου, έχει παρατηρηθεί ότι σε πτηνοσφαγεία μικρής ή μεσαίας δυναμικότητας, όπως τα πτηνοσφαγεία της έρευνάς μας, των οποίων τα σφάγια παρουσιάζουν χαμηλό ποσοστό μόλυνσης με *Salmonella* spp., η μόλυνση των επιφανειών τους είναι περιορισμένη όταν συνδυάζονται με επαρκή προγράμματα καθαρισμού και απολύμανσης (EFSA, 2011). Αυτό επιβεβαιώνεται και από το ότι δεν ανιχνεύθηκαν στελέχη *Salmonella* spp. στις επιφάνειες των άλλων τριών πτηνοσφαγείων (1,3 και 4), των οποίων τα σφάγια παρουσίαζαν χαμηλότερο επιπολασμό των *Salmonella* spp. (23%, 12% και 64%, αντιστοίχως).

2.5.2 Κατανομή των οροτύπων *Salmonella* spp. στα σφάγια ορνιθίων

Ο ορότυπος *S. Blockley* ήταν ο επικρατέστερος ορότυπος που απομονώθηκε από τα δείγματα της παρούσας έρευνας, γεγονός που συμφωνεί με τα στοιχεία που δημοσιοποιήθηκαν για την Ελλάδα από μία Ευρωπαϊκή έρευνα που έγινε για τα έτη 2006-2007 (EFSA, 2007). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας δεν συμπίπτουν με αυτά προηγούμενων ερευνών που έγιναν στην Ελλάδα. Σύμφωνα με τους Arvanitidou και συν. (1998) 6 διαφορετικοί ορότυποι απομονώθηκαν, με τον *S. Enteritidis* να είναι ο επικρατέστερος και να αντιστοιχεί σε 26 στελέχη (41,9%). Ο ορότυπος *S. Anatum* βρέθηκε σε 17 στελέχη (27,4%), ο *S. Bredeney* σε 14 στελέχη (22,6%), ενώ σε μικρότερη συχνότητα βρέθηκαν ο *S. Derby*, ο *S. Virchow* (από δυο στελέχη ο καθένας) και ο *Salmonella* 4:b:-serotype (σε ένα στέλεχος). Οι Alexandridou και συν. (2001) απομόνωσαν στελέχη *Salmonella* spp. που ανήκαν σε 11 διαφορετικούς οροτύπους με επικρατέστερους τους *S. Bredeney*, *S.*

Enteritidis και S. II (S. Sofia), ενώ τα στελέχη που απομόνωσαν οι Karabaxoglou και συν. (1996) ήταν κυρίως S. Enteritidis (86%) και S. Livingstone (14%).

Οι 5 πιο συνήθεις ορότυποι *Salmonella* spp., για τα έτη 2005-2006, που απομονώθηκαν από σμήνη ορνιθίων κρεοπαραγωγής στην Ευρωπαϊκή Ένωση ήταν κατά φθίνουσα σειρά οι S. Enteritidis, S. Infantis, S. Mbandaka, S. Typhimurium και S. Hadar. Σύμφωνα με το Enter-net (το διεθνές δίκτυο για την παρακολούθηση της *Salmonella* spp. και των οροτοξινογόνων λοιμώξεων της *Escherichia coli*) ο ορότυπος S. Blockley έχει απομονωθεί σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις από το Δυτικό Ημισφαίριο και αντιπροσώπευε μόνο το 0,6% των οροτύπων *Salmonella* spp. που είχαν απομονωθεί στην Ευρώπη στο πρώτο τετράμηνο του 1998, ενώ ο ορότυπος S. Enteritidis αντιπροσώπευε το 67,1%. Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στη Λιθουανία (Pieskus και συν., 2006), Ισπανία (Dominguez και συν., 2002), Πορτογαλία (Antunes και συν., 2003), Βέλγιο (Uyttendaele και συν., 1998), Ελλάδα (Arvanitidou και συν., 1998) ανέφεραν ως επικρατέστερο ορότυπο τον S. Enteritidis, ενώ ο S. Blockley ήταν απών ή σπάνιος. Αντιθέτως, ο ορότυπος S. Blockley ήταν ανάμεσα στους 5 πιο συχνά απομονωμένους ορότυπους από πτηνά και ανθρώπους στην Ιαπωνία (Limawongpranee και συν., 1999; Matsushita και συν., 1996), στη Μαλαισία (Rusul και συν., 1996; Yasin και συν., 1996) και στην Ταϊλάνδη (Sasipreeyajan και συν., 1996). Στην Ελλάδα, ο ορότυπος S. Blockley αντιστοιχούσε στα 7 από τα 13.199 στελέχη *Salmonella* spp. που ταυτοποιήθηκαν από το 1976 έως το 1997. Ωστόσο, 35 περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας που καταγράφηκαν στο χρονικό διάστημα μεταξύ Μαΐου και Δεκεμβρίου του 1998 οφείλονταν σε αυτόν τον ορότυπο (Vassilogianakopoulos και συν., 1999). Παρ' όλα αυτά, οι ορότυποι S. Enteritidis και S. Typhimurium αποτέλεσαν τις πιο συχνές αιτίες πρόκλησης ανθρώπινης Σαλμονέλλωσης, σε κοινοτικό επίπεδο, για τα έτη 2006 και 2007. (EFSA, 2009).

Η έρευνα μας δείχνει ότι η κατανομή των οροτύπων των *Salmonella* spp. μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τη χρονική περίοδο της μελέτης και ότι ο ορότυπος S. Blockley θα πρέπει να θεωρείται πλέον ως ένας

από τους επικρατέστερους ορότυπους *Salmonella* spp. που απομονώνονται από σφάγια ορνιθίων. Επιπλέον, η ποικιλότητα των οροτύπων μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές πηγές μόλυνσης, όπως είναι η επαφή με άλλα είδη αγροτικών και άγριων ζώων, τα μολυσμένα με *Salmonella* spp. σιτηρέσια και οι εμμένουσες λοιμώξεις των πτηνοτροφείων μεταξύ διαδοχικών σμηνών (EFSA, 2007).

2.5.3 Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων

Αξιολογήθηκε η δράση 20 αντιμικροβιακών παραγόντων, με γνωστή δράση έναντι των *Salmonella* spp., στα 59 στελέχη. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Tassios και συν. (2000) οι οποίοι ανέφεραν ότι όλα τα στελέχη *S. Blockley* ήταν ευαίσθητα στη τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη, αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη/κλαβουλανικό οξύ, γενταμικίνη και σιπροφλοξακίνη, ενώ παρουσίαζαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (100%), στρεπτομυκίνη και καναμυκίνη (90%), χλωραμφαινικόλη (83%) και ναλιδιξικό οξύ (52%). Ωστόσο, έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Arvanitidou και συν. (1998) οι οποίοι παρατήρησαν χαμηλά ποσοστά ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνη και στρεπτομυκίνη των στελεχών *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων της ευρύτερης περιοχής της Θεσσαλονίκης. Το γεγονός αυτό μπορεί να αντανakλά διαφορές στη χρήση των ανωτέρω αντιβιοτικών καθώς επίσης αποδεικνύει τη σταδιακή προσαρμογή των βακτηρίων σε αυτά και την ανάπτυξη, με την πάροδο των ετών, ενδεχόμενης ανθεκτικότητας απέναντι τους.

Τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στην πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, νεομυκίνη, ναλιδιξικό οξύ, καναμυκίνη και τετρακυκλίνη που παρατηρήθηκαν στην έρευνά μας είναι υψηλότερα από αυτά που αναφέρονται για την Ισπανία (Carraminama και συν., 2004), Πορτογαλία (Antunes και συν., 2003), Η.Π.Α. και Κίνα (Chen και συν., 2004), Βραζιλία (Cardoso και συν., 2006; Dias de

Oliveira και συν., 2005) και Ντακάρ (Bada-Alambedji και συν., 2006). Το ποσοστό της ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη που βρέθηκε στην έρευνα μας ήταν μικρότερο μόνο από το αντίστοιχο (100%) που βρέθηκε από τους Cardoso και συν. (2006) για στελέχη *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων κρεοπαγωγής στη Βραζιλία. Τα υψηλά αυτά ποσοστά ανθεκτικότητας στην πενικιλίνη, ερυθρομυκίνη, στρεπτομυκίνη, νεομυκίνη, καναμυκίνη και τετρακυκλίνη πιθανόν να συνδέονται με τη συνεχή χρήση των αντιβιοτικών αυτών ως προληπτικοί ή θεραπευτικοί παράγοντες στα πτηνοτροφεία.

Η ανθεκτικότητα του 80% των στελεχών που απομονώθηκαν στην χλωραμφαινικόλη είναι αξιοσημείωτη καθώς η χρήση της έχει απαγορευτεί από τις αρχές της δεκαετίας του '90. Μπορεί βέβαια να εξηγηθεί είτε ως εμμένουσα επίκτητη ανθεκτικότητα είτε ως διασταυρούμενη ανθεκτικότητα σε άλλους μη σχετικούς παράγοντες (Astorga Marquez και συν., 2007; Bywater και συν., 2004).

Η ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη ήταν επίσης ένα μάλλον αναπάντεχο εύρημα. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '90 πολλές έρευνες απέδειξαν ότι η αβοπαρσίνη, ένα αντιμικροβιακό γλυκοπεπτίδιο που συνδέεται με τη βανκομυκίνη, ήταν υπεύθυνη για τη μαζική παρουσία ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων στο έντερο των αγροτικών ζώων, των οποίων το σιτηρέσιο περιείχε αυτή την ουσία ως αυξητικό παράγοντα (Aarestrup, 2006).

Το υψηλό ποσοστό ανθεκτικότητας των στελεχών της παρούσας έρευνας είναι αξιοσημείωτο και αποδεικνύει ότι το κοτόπουλο αποτελεί μια σημαντική δεξαμενή Σαλμονελών πολυανθεκτικών στους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Η πολυανθεκτικότητα παρατηρείται συχνά μεταξύ των στελεχών *Salmonella* spp. και έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Antunes και συν., 2003; Carraminama και συν., 2004; Miranda και συν., 2009). Πολυανθεκτικά στελέχη μπορεί να προκύψουν ως αποτέλεσμα ταυτόχρονης πίεσης επιλογής από πολλαπλές αντιβιοτικές ουσίες. Η πίεση επιλογής δεν είναι όμως η μοναδική αιτία της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών. Η χρήση ενός και μόνου αντιβιοτικού μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση

ανθεκτικότητας και σε άλλες αντιβιοτικές ουσίες χωρίς καμία προηγούμενη έκθεση τους σ' αυτές (Sayah και συν., 2005).

Το χαμηλό ποσοστό ανθεκτικότητας στην τριμεθοπρίμη/ σουλφομεθοξαζόλη ήταν συγκρίσιμο με το ποσοστό που αναφέρθηκε από τους Chen και συν. (2004) σε στελέχη *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από κρέατα λιανικής στις Η.Π.Α. και στη Λαϊκή Δημοκρατία της Κίνας (Chen και συν., 2004), υψηλότερο από αυτό που βρέθηκε σε στελέχη *Salmonella* spp. από κοτόπουλα στη Βραζιλία (Cardoso και συν., 2006), από προϊόντα κοτόπουλου στην Πορτογαλία (Antunes και συν., 2003) και πτηνοσφαγεία στην Ισπανία (Carraminama και συν., 2004) και χαμηλότερο από το ποσοστό που εντοπίστηκε σε σφάγια ορνιθίων στο Ντακάρ (Bada-Alamedji και συν., 2006).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δεν βρέθηκε ανθεκτικότητα στην ενροφλοξακίνη, σιπροφλοξακίνη, κεφοταξίμη (3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνη) και γενταμικίνη, ενώ το ναλιδιξικό οξύ ήταν η μοναδική κινολόνη στην οποία εμφάνιζαν ανθεκτικότητα τα στελέχη *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν στην έρευνα μας. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό εύρημα καθώς οι αντιμικροβιακές αυτές ουσίες είναι ιδιαίτερης σημασίας για την ιατρική. Η σιπροφλοξακίνη αποτελεί το αντιβιοτικό επιλογής για τη θεραπεία των σοβαρών εν τω βάθει λοιμώξεων του γαστρεντερικού συστήματος όπως είναι οι σαλμονελώσεις και οι σοβαρές καμπυλοβακτηριώσεις (Travers και Barza, 2002). Επιπροσθέτως, οι κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος χρησιμοποιούνται συνήθως στην παιδιατρική, καθώς οι φλουοροκινολόνες δεν ενδείκνυνται προς το παρόν λόγω της ενδεχόμενης πιθανότητας να προκαλούν αρθροπάθειες (Aarestrup, 2006).

Οκτώ διαφορετικοί φαινότυποι ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες βρέθηκαν στην παρούσα έρευνα (Πίνακας 2.4). Κάθε ορότυπος συνδεόταν με έναν φαινότυπο ανθεκτικότητας και μόνο οι ορότυποι *S. Paratyphi B* και *S. Bredeney* συνδεόντουσαν με δύο φαινότυπους έκαστος. Τα στελέχη του οροτύπου *S. Thompson* παρουσίαζαν τη μικρότερη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ενώ τα πιο ανθεκτικά ήταν τα στελέχη του

οροτύπου S. Neftenbach ακολουθούμενα από αυτά του οροτύπου S. Blockley. Ο ορότυπος S. Hadar που έχει αναγνωρισθεί πρόσφατα από τη Ευρωπαϊκή Ένωση ως ιδιαίτερης σημασίας για τη δημόσια υγεία (Κοινοτικός Κανονισμός 2160/2003) παρουσίασε ανθεκτικότητα σε πενικιλίνη + τετρακυκλίνη + στρεπτομυκίνη + βανκομυκίνη + ερυθρομυκίνη + ναλιδιξικό οξύ + κλινδαμυκίνη + οξολινικό οξύ + οξυτετρακυκλίνη. Σε πολλές έρευνες έχει παρατηρηθεί ένας φαινότυπος ανθεκτικότητας της στρεπτομυκίνης που συνδέεται με την τετρακυκλίνη (Antunes και συν., 2003; Dias de Oliveira και συν., 2005). Στην έρευνα μας, όλα τα στελέχη, εκτός από έξι, που ήταν ανθεκτικά στην στρεπτομυκίνη ήταν ανθεκτικά και στην τετρακυκλίνη, ένα στέλεχος ήταν ανθεκτικό μόνο στην τετρακυκλίνη, τέσσερα στελέχη ήταν ανθεκτικά μόνο στην στρεπτομυκίνη και ένα στέλεχος ήταν ευαίσθητο και στην στρεπτομυκίνη και στην τετρακυκλίνη.

Πίνακας 2.4: Φαινότυποι ανθεκτικότητας των οροτύπων *Salmonella* spp. που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων (Αριθμός στελεχών οροτύπου με τον ίδιο φαινότυπο / Συνολικός αριθμός στελεχών οροτύπου).

Φαινότυποι ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες	Ορότυποι <i>Salmonella</i> spp.
Βανκομυκίνη - Ερυθρομυκίνη - Καναμυκίνη - Κλινδαμυκίνη - Νεομυκίνη - Ναλιδιξικό οξύ - Οξολινικό οξύ - Οξυτετρακυκλίνη - Πενικιλίνη - Τετρακυκλίνη - Στρεπτομυκίνη - Χλωραμφαινικόλη	S. Blockley 42/42
Βανκομυκίνη - Ερυθρομυκίνη - Κλινδαμυκίνη - Ναλιδιξικό οξύ - Οξολινικό οξύ - Πενικιλίνη - Στρεπτομυκίνη	S. Paratyphi B 6/8
Βανκομυκίνη - Ερυθρομυκίνη - Κλινδαμυκίνη - Ναλιδιξικό οξύ - Οξολινικό οξύ - Οξυτετρακυκλίνη - Πενικιλίνη - Στρεπτομυκίνη - Τετρακυκλίνη	S. Paratyphi B 2/8
Βανκομυκίνη - Ερυθρομυκίνη - Κλινδαμυκίνη - Ναλιδιξικό οξύ - Οξολινικό οξύ - Οξυτετρακυκλίνη - Πενικιλίνη - Τετρακυκλίνη - Στρεπτομυκίνη -	S. Hadar 2/2
Αμπικιλίνη - Αμοξικιλίνη - Βανκομυκίνη - Ερυθρομυκίνη - Καναμυκίνη - Κλινδαμυκίνη - Νεομυκίνη - Οξυτετρακυκλίνη - Πενικιλίνη - Σουλφομεθοξαζόλη + Τριμεθοπρίμη - Στρεπτομυκίνη - Τετρακυκλίνη - Χλωραμφαινικόλη	S. Neftenbach 2/2
Αμπικιλίνη - Αμοξικιλίνη - Βανκομυκίνη - Ερυθρομυκίνη - Κλινδαμυκίνη - Οξυτετρακυκλίνη - Πενικιλίνη - Σουλφομεθοξαζόλη + Τριμεθοπρίμη - Στρεπτομυκίνη - Τετρακυκλίνη - Χλωραμφαινικόλη	S. Bredeney 3/4
Βανκομυκίνη - Ερυθρομυκίνη - Καναμυκίνη - Κλινδαμυκίνη - Νεομυκίνη - Οξυτετρακυκλίνη - Πενικιλίνη - Τετρακυκλίνη -	S. Bredeney 1/4
Βανκομυκίνη - Ερυθρομυκίνη - Κλινδαμυκίνη - Πενικιλίνη	S. Thompson 1/1

Τα αποτελέσματα της έρευνας μας έδειξαν ένα υψηλό ποσοστό παρουσίας *Salmonella* spp. στα σφάγια ορνιθίων, που προέρχονται από πτηνοσφαγεία της Βόρειας Ελλάδας, και ένα αντίστοιχα υψηλό ποσοστό πολυανθεκτικότητας, που παρατηρείται μεταξύ των στελεχών *Salmonella* spp., με φαινότυπους ανθεκτικότητας που αντανάκλουν την εκτεταμένη χρήση των αντιβιοτικών. Τα στοιχεία αυτά υπογραμμίζουν τη σημασία του ελέγχου του συγκεκριμένου παθογόνου στα προϊόντα από ορνίθιο κρέας και καθιστούν επιτακτική την ανάγκη για μια πιο ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών και για συνεχή παρακολούθηση της χρήσης των αντιμικροβιακών παραγόντων. Ο έλεγχος της Σαλμονέλλωσης είναι εξαιρετικά δύσκολος και η αφαίρεση του μικροοργανισμού αυτού από την τροφική αλυσίδα είναι πρακτικά αδύνατη. Ωστόσο, λαμβάνοντας τα κατάλληλα μέτρα, όπως η βελτίωση της υγιεινής κατά τη σφαγή, η εφαρμογή συστημάτων HACCP και η επανεξέταση των ελέγχων της διαδικασίας σφαγής, της προέλευσης του σμήνους και των μέτρων βιοπροστασίας που μπορούν να εφαρμοστούν στα πτηνοτροφεία, τα επίπεδα των *Salmonella* spp. στο ωμό κοτόπουλο μπορεί να μειωθούν σημαντικά.

2.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aarestrup, F. M. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press, Washington, USA, 390-391.
- Abraham, A., Papa, A., Soultos, N., Ambrosiadis, I., Antoniadis, A. 1998. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. isolates from traditionally made fresh sausages in Greece, Journal of Food Protection 61 (10), 1378–1380.
- Alexandridou, O., Genigeorgis, C., Sarris K. 2001. Postharvest epidemiology of *Salmonella* spp. in three chicken slaughterhouses. Abstract book 2nd Balkan Conference of Microbiology, 112.

- Allen, V.M., Corry, J.E.L., Burton, C.H., Whyte, R.T., Mead, G.C. 2000. Hygiene aspects of modern poultry chilling. *International Journal of Food Microbiology* 58, 39-48.
- Antunes, P., Reu, C., Sousa, J.C., Peixe, L., Pestana, N. 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* 82, 97–103.
- Arvanitidou, M., Tsakris, A., Sofianou, D., Katsouyannopoulos V. 1998. Antimicrobial resistance and R-factor transfer of salmonellae isolated from chicken carcasses in Greek hospitals. *International Journal of Food Microbiology* 40, 197-201.
- Astorga Márquez, R.J., Echeita Salaberria, A., Maldonado García, A., Valdezate Jimenez, S., Carbonero Martinez, A., Aladueña García, A., Arenas Casas, A. 2007. Surveillance and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains isolated from slaughtered pigs in Spain. *Journal of Food Protection* 70(6), 1502-1506.
- Bada-Alamedji, R., Fofana, A., Sedi, M., Akakpo, A.J. 2006. Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated from Poultry Carcasses in Dakar (Senegal). *Brazilian Journal of Microbiology* 37, 510-515.
- Barbosa, T. M., Levy, S. B. 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Update* 3, 303–311.
- Bryan, F.L., Doyle, M.P. 1995. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *Journal of Food Protection* 58, 326– 344.
- Busani, L., Graziani, C., Battisti, A., Franco, A., Ricci, A., Vio, D., Digiannatale, E., Paterlini, F., D'Incau, M., Owczarek, S., Caprioli, A., Luzzi I. 2004. Antibiotic resistance in *Salmonella* enterica serotypes Typhimurium, Enteritidis and Infantis from human infections, foodstuffs and farm animals in Italy. *Epidemiology and Infection* 132(2), 245-251.

- Bywater, R., Deluyker, H., Deroover, E., de Jong, A., Marion, H., McConville, M., Rowan, T., Shuster, D., Thomas, V., Valle, M., Walters J. 2004. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, 744-754.
- Cardoso, M.O., Ribeiro, A.R., Santos, L.R., Pilotto, F., Moraes, H.L.S., Salle, C.T.P., Rocha, S.L.S., Nascimento, V.P. 2006. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology* 37, 368-371.
- Carraminana, J.J., Rota, C., Agustín, I., Herrera A. 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology* 104, 133-139.
- Chen, S., Zhao, S., White, D.G., Schroeder, C.M., Lu, R., Yang, H., McDermott, P.F., Ayers, S., Meng, J., 2004. Characterization of multiple antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1–7.
- Colin, P., and Corry, J.E.L (eds). 1999. Developments in Microbial Methods. In “Microbial Control in the Meat Industry”. A Flair Flow Europe Training Workshop. RE.TU.ER. Northern Ireland, 158-181.
- Dias de Oliveira, S., Flores, F.S., dos Santos, L.R., Brandelli, A. 2005. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry related samples. *International Journal of Food Microbiology* 97, 297-305.
- Dominguez, C., Gomez, I., Zumalacarregui, J. 2002. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology* 72, 165-168.
- Doyle, M. and Beuchat, L. 2007 *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. 3rd edition. ASM Press, Washington, USA.

- Dupont, H.L., Steele J.H. 1987. Use of antimicrobial agents in animal feeds: implications for human health. *Reviews of Infectious Diseases* 9, 447–460.
- Endtz, H.P., Ruijs, G.J., van Klingeren, B., Jansen, W.H., van der Reyden, T., Mouton, R.P. 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 27, 199–208.
- European Commission. 17 November 2003. Regulation (EC) 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of the European Union. Official Journal of the European Union L 325/1.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2007. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*, Part A, The EFSA Journal 98, 1-85.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2009. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007, The EFSA Journal 223.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. The EFSA Journal 9(3), 1-378.
- Fey, P.D., Safranek, T.J., Rupp, M.E., Dunne, E.F., Ribot, E., Iwen, P.C., Angulo, F.J., Hinrichs, S.H. 2000. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *The New England Journal of Medicine* 342, 1242-1249.
- Fisher IST, on behalf of Enter-net participants. Enternet Quarterly Salmonella Report - 98/3 (1998 Jul-Sep). Available from: URL: <http://www2.phls.co.uk/reports/latest.htm>.

- Franco, D.A., Webb, J., Taylor, C.E. 1990. Antibiotic and sulfonamide residues in meat. Implications for human health. *Journal of Food Protection* 53, 178– 185.
- Gebreyes, W. A., Altier, C. 2002. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2813–2822.
- Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R., Mendoza, M. C. 2002. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 2977–2981.
- ISO 6579:2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* species.
- ISO 17604:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis.
- Jay, J., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. *Modern Food Microbiology*. 7th edition. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA, pp. 88 – 91.
- Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D. R. A., Bolton, F. J., Frost, J. A., Ward, L., Humphrey, T. J. 2002. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International journal of Food Microbiology* 76(1-2), 151-64.
- Karabaxoglou, D., Papa, A., Kansouzidou, A., Triantafyllou, G., Mitka, S., Amin, A., Danielides, B. 1996. Incidence of *Salmonella* spp. in chickens consumed in hospitals of Thessaloniki, Greece. *Acta Microbiologica Hellenica* 41 (3), 230-233.
- Limawongpranee, S., Hayashidani, H., Okatani, A.T., Ono, K., Hirota, C., Kaneko, K. 1999. Prevalence and persistence of *Salmonella* in broiler chicken flocks. *The Journal of Veterinary Medical Science* 61, 255-259.

- Matsushita, S., Yamada, S., Sekiguchi, K., Kusunokui, J., Ohta, K., Kudoh, Y. 1996. Serovar-distribution and drug resistance of *Salmonella* strains isolated from domestic and imported cases in 1990-1994 in Tokyo. *Kansenshogaku Zasshi* 70, 42-50.
- Mead G.C. 2005. Food safety control in the poultry industry W.P.L. Cambridge England, pp. 315 – 320.
- Miranda, J.M., Mondragon, A.C., Martinez, B., Guarddon, M., Rodriguez J.A. 2009. Prevalence and Antimicrobial Patterns of *Salmonella* from Different Raw Foods in Mexico. *Journal of Food Protection* 72(5), 966-971.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 14th informational supplement M100 –S14. Vol. 24 No 1. Wayne Pa.
- Olah, P.A., Sherwood, J.S., Elijah, L.M., Dockter, M.R., Logue C.M. 2004. Comparison of Antimicrobial Resistance of *Salmonella* and *Campylobacter* Isolated from Midwestern Turkey Production Lines, *Food Microbiology* 21, 779–789.
- Padungtod, P., Kaneene, J.B. 2006. *Salmonella* in food animals and humans in Northern Thailand. *International Journal of Food Microbiology* 108, 346 – 354.
- Parveen, S., Taabodi, M., Schwarz, J. G., Oscar, T. P., Harter-Dennis, J., White, D. G. 2007. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry. *Journal of Food Protection* 70(11), 2466-72.
- Pieskus, J., Milius, J., Michalskiene, I., Zagrebneviene, G. 2006. The distribution of *Salmonella* Serovars in Chicken and Humans in Lithuania. *Journal of Veterinary Medicine A* 53, 12-16.
- Ray, B., Bhunia, A. 2008. *Fundamental Food Microbiology*. 4th edition. CRC Press, Florida, USA, pp. 35 – 36.

- Reiter, M.G., Fiorese, M.L., Moretto, G., López, M.C. and Jordano, R. 2007. Prevalence of *Salmonella* in a poultry slaughterhouse. *Journal of Food Protection* 70(7), 1723-1725.
- Rusul, G., Khair, J., Radu, S., Cheah, C. T., Yassin R. M. 1996. Prevalence of *Salmonella* in broilers at retail outlets, processing plants and farms in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology* 33, 183-94.
- Sarlin, L. L., Barnharte, E. T., Caldwell, D. J., Moore, R. W., Byrd, J. A., Caldwell, D. Y., Corried, D. E., Deloach, J. R., Hargis B. M. 1998. Evaluation of Alternative Sampling Methods for *Salmonella* Critical Control Point Determination at Broiler Processing. *Poultry Science* 77, 1253-1257.
- Sasipreeyajan, J., Jerngklinchan, J., Koowatananukul, C., Saitanu, K. 1996. Prevalence of salmonellae in broiler, layer and breeder flocks in Thailand. *Tropical Animal Health and Production* 28, 174-80.
- Sayah, R. S., Kaneene, J. B., Johnson, Y., Miller, R. 2005. Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic- and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1394-1404.
- Schmidt, K. 1998. Situation of foodborne diseases in Europe, 1992 – 1996. *Proceedings 4th World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin, 7 – 12 June 1998, vol. 1. Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, Berlin, 262–266.*
- Schmidt, K., Gervelmeyer, A. 2003. WHO Surveillance Programme for control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 8th Report 1999-2000. BfR-FAO/WHO Collaborating Centre for research and Training In Food Hygiene and Zoonoses, Berlin.

- Schmidt, K., Tirado, C. 2001. WHO Surveillance Programme for control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 7th Report 1993-1998. BGVV-FAO/WHO Collaborating Centre for research and Training In Food Hygiene and Zoonoses, Berlin.
- Schwarz, S., Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research* 32, 201–225.
- Smith, K.E., Besser, J.M., Hedberg, C.W., Leano, F.T., Bender, J.B., Wicklund, J.H., Johnson, B.P., Moore, K.A., Osterholm, M.T. 1999. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992 – 1998. Investigation Team. *The New England Journal of Medicine* 340, 1525–1532.
- Soultos, N., Koidis, P., Madden, B. 2003. Presence of *Listeria* and *Salmonella* spp. in retail chicken in Northern Ireland. *Letters in Applied Microbiology* 37, 421-423.
- Tassios, P.T., Chadjihristodoulou, C., Lambiri, M., Kansouzidou-Kanakoudi, A., Sarandopoulou, Z., Kourea-Kremastinou, J., Tzouveleki, L.S., Legakis, N.J. 2000. Molecular typing of multidrugresistant *Salmonella* Blockley outbreak isolates from Greece. *Emerging Infectious Diseases* 6, 60-64.
- Tassios, P.T., Markogiannakis, A., Vatopoulos, A.C., Katsanikou, E., Velonakis, E.N., Kourea-Kremastinou, J., Legakis, N.J. 1997. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis during a 7-year period in Greece. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1316–1321.
- Threlfall, E.J. 2002. Antimicrobial drug resistance in Salmonella: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiology Reviews* 742, 1-8.

- Travers, K., Barza, M. 2002. Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 34, 131–134.
- Uyttendaele, M.R., Debevere, J.M., Lips, R.M., Neyts K.D. 1998. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* 40, 1-8.
- Vassilogiannakopoulos, A, Tassios, P, Lampiri, M. 1999. *Salmonella blockley* infection in Greece. *Eurosurveillance Weekly* 3:990408. Available at URL: <http://www.eurosurv.org/1999/990408.htm>.
- WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infection and Intoxications in Europe 8th Report 1999-2000.
- Yasin, R.M., Jegathesan M.M., Tiew, C.C. 1996. *Salmonella* serotypes isolated in Malaysia over the ten-year period 1983-1992. *Asia-Pacific Journal of Public Health* 9, 1-5.

Κεφάλαιο 3^ο

**Διερεύνηση της
παρουσίας και της
αντιμικροβιακής
αντοχής στελεχών
Listeria monocytogenes
που απομονώθηκαν
από σφάγια ορνιθίων
στη Β. Ελλάδα**

3.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η έρευνα αυτή περιλαμβάνει στο πρώτο στάδιο την αναζήτηση λιστεριών σε δείγματα προερχόμενα αφ' ενός από σφάγια ορνιθίων κρεοπαραγωγής και αφ' ετέρου από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων. Εξετάστηκαν συνολικά 100 δείγματα δέρματος τραχήλου προερχόμενα από 300 σφάγια ορνιθίων, και 40 δείγματα επιφανειών, προερχόμενα από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων. Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν (σφάγια – περιβάλλον) ελήφθησαν από 4 πτηνοσφαγεία της Βόρειας Ελλάδας.

Listeria spp. και *Listeria monocytogenes* απομονώθηκαν σε ποσοστό 99% και 38%, αντιστοίχως, του συνόλου των εξετασθέντων δειγμάτων σφαγίων ορνιθίων. Όσον αφορά τη μόλυνση του περιβάλλοντος των πτηνοσφαγείων, όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν βρέθηκαν μολυσμένα με *Listeria* spp. ενώ *L. monocytogenes* απομονώθηκε από το περιβάλλον ενός μόνο πτηνοσφαγείου σε ποσοστό 80%.

Στο δεύτερο στάδιο της έρευνας έγινε γενετική τυποποίηση και έλεγχος της ευαισθησίας, σε 20 αντιμικροβιακούς παράγοντες, 55 επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από τα σφάγια των ορνιθίων και το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο RAPD, τα στελέχη της *L. monocytogenes* κατηγοριοποιήθηκαν σε 2 κλάδους και 10 υποκλάδους. Όλα τα στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά σε δύο αντιμικροβιακούς παράγοντες (ναλιδιξικό και οξολινικό οξύ), ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών βρέθηκαν να είναι ευαίσθητα στους υπόλοιπους.

Τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν ένα σημαντικό ποσοστό μόλυνσης των σφαγίων ορνιθίων με *Listeria monocytogenes* ενώ τα στελέχη που απομονώθηκαν βρέθηκαν να είναι ευαίσθητα στους αντιμικροβιακούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται συχνότερα για τη θεραπεία της λιστερίωσης σε ανθρώπους.

3.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Listeria monocytogenes* αναγνωρίστηκε διεθνώς ως αναδυόμενος τροφιμογενής παθογόνος μικροοργανισμός στις αρχές της δεκαετίας του '80 και από τότε αυξήθηκε το ενδιαφέρον σε όλο τον κόσμο για τον μικροοργανισμό αυτό. Σε αντίθεση με άλλες βακτηριακές λοιμώξεις που σχετίζονται με τα τρόφιμα, η λιστερίωση παρουσιάζει ένα υψηλό ποσοστό θνητότητας (10-30%) (Doganay, 2003; Farber και Peterkin, 1991; Swaminathan, 2001), ιδιαίτερα μεταξύ των πληθυσμιακών ομάδων υψηλού κινδύνου. Οι έγκυες γυναίκες, τα νεογνά, οι ενήλικες με σοβαρά προβλήματα υγείας, οι ηλικιωμένοι και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα είναι ιδιαίτερα ευπαθή στη λοίμωξη (Ceylan και συν., 2008, De Cesare και συν., 2006; Uyttendaele και συν., 1997). Σύμφωνα με την πρόσφατη Κοινοτική Έκθεση, 1.381 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις λιστερίωσης έχουν καταγραφεί στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το 2008 και η αναφερόμενη θνητότητα έφτασε το 20,5%. Στην Ελλάδα η λιστερίωση δεν είναι συνηθισμένη και μόνο σποραδικά κρούσματα έχουν καταγραφεί (EFSA, 2010). Η συχνότητα εμφάνισης της λιστερίωσης στην Ευρωπαϊκή Ένωση για το 2008 ήταν 0,3 κρούσματα / 100.000 κατοίκους ενώ στις Η.Π.Α. κυμάνθηκε από 0,3 έως 0,6 κρούσματα / 100.000 κατοίκους ετησίως για τα έτη 1996-2000 (Saunders και συν., 2003).

Ο “πανταχού παρών” χαρακτήρας της *Listeria* ευθύνεται για την ευρεία διάδοση της στο περιβάλλον. Είναι ικανή να αναπτύσσεται σε θερμοκρασία ψύξης (Gandhi και Chikindas, 2007; Lado και Yusef, 2007) και μπορεί να επιβιώνει ή ακόμα και να πολλαπλασιάζεται στα φυτά, στο έδαφος και στο νερό (Kosek-Paszowska και συν., 2005; Liu, 2008; Meng και Doyle, 1998; Norrung και συν., 2009; Uyttendaele και συν., 1997).

Αν και το ορνίθιο κρέας σπάνια έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση λιστερίωσης (Uyttendaele και συν., 1997), το σχετικά υψηλό ποσοστό παρουσίας της *Listeria monocytogenes* στα σφάγια των ορνιθίων αποτελεί πιθανό κίνδυνο. Η πρώτη αποδεδειγμένη περίπτωση λιστερίωσης της οποίας αίτιο ήταν κάποιο τρόφιμο ζωικής προέλευσης αναφέρθηκε στο Ηνωμένο

Βασίλειο (Kerr και συν., 1988), όπου μαγειρεμένο κοτόπουλο που αγοράστηκε από πολυκατάστημα ενοχοποιήθηκε για την πρόκληση συμπτωμάτων όμοιων με εκείνων μιας γριππώδους συνδρομής σε έγκυο γυναίκα, η οποία απέβαλλε αυτόματα νεκρό έμβρυο 23 εβδομάδων. Η *L. monocytogenes* απομονώθηκε από το ψημένο κοτόπουλο, από το αίμα της γυναίκας και από δείγματα προερχόμενα από το έμβρυο. Η μέση συχνότητα απομόνωσης της *Listeria monocytogenes* από σφάγια ορνιθίων σε παγκόσμια κλίμακα είναι περίπου 17% (Jay, 1996), παρόμοια με το βόειο και το πρόβειο κρέας, και κυμαίνεται από 4,3% στην Κορέα (Beak και συν., 2000) έως 75% στην Εσθονία (Praakle-Amin και συν., 2006).

Όπως αναφέρεται από πολλούς ερευνητές (Antunes και συν., 2002; Franco και συν., 1995, Genigeorgis και συν., 1989; Lawrence και Gilmour, 1994; Uyttendaele και συν., 1999), η παρουσία της *Listeria monocytogenes* στο ορνίθειο κρέας μπορεί να αποδοθεί στο μολυσμένο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων και στις συνθήκες κάτω από τις οποίες προετοιμάστηκαν τα σφάγια και τα προϊόντα τους. Οι πύλες εισόδου του βακτηρίου στο πτηνοσφαγείο είναι ποικίλες και πολυάριθμες. Εφόσον εισέλθει η *Listeria monocytogenes* στο πτηνοσφαγείο, μπορεί να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα και να επιβιώνει παρά την εφαρμογή των προγραμμάτων καθαρισμού και εξυγίανσης (Fenlon και συν., 1996; Franco και συν., 1995; Genigeorgis και συν., 1989; Hudson και Mead, 1989; Ojieniyi και συν., 1996). Τα σημεία του πτηνοσφαγείου που έχουν βρεθεί θετικά στη *Listeria monocytogenes* περιλαμβάνουν τις επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα του μηχανολογικού εξοπλισμού, τους ιμάντες μεταφοράς, τις χειρολαβές των θυρών, το δάπεδο, τις σφουγγαρίστρες που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό του δαπέδου, τα γάντια του προσωπικού και οι αποχετεύσεις (Lawrence και Gilmour, 1994). Μία εξήγηση για την παραμονή και την επιβίωση της *L. monocytogenes* στο πτηνοσφαγείο αποτελεί η προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με το ορνίθειο κρέας. Σύμφωνα με τους Mafu και συν. (1990), τα βακτήρια που προσκολλώνται στις επιφάνειες μπορούν να σχηματίσουν ένα δυναμικό περιβάλλον μικρών αποικιών των οποίων η ανάπτυξη και ο

πολλαπλασιασμός επιτρέπουν την ανάπτυξη ενός πολυκυτταρικού στρώματος βιοϋμενίου. Το υμένιο αυτό μπορεί να απελευθερώνει συνεχώς βακτήρια στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να επιμολύνονται τα προϊόντα του πτηνοσφαγείου. Επιπλέον, οι Mosteller και Bishop (1993) υποστήριξαν ότι ο σχηματισμός αυτών των υμενίων μπορεί να προστατεύσει τα βακτηριακά κύτταρα από τα προϊόντα καθαρισμού και να αποτελέσουν μια σημαντική δεξαμενή της *L. monocytogenes* στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων.

Η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνιατρική και ιατρική πράξη έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, στα οποία περιλαμβάνεται και η *Listeria*. Λόγω της σοβαρότητας και του ποσοστού θνητότητας της λιστερίωσης, η θεραπεία με αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση της λοίμωξης. Γενικώς, τα στελέχη των *Listeria* spp. θεωρούνται ευαίσθητα στους αντιμικροβιακές παράγοντες που χρησιμοποιούνται συνήθως εναντίον των Gram θετικών βακτηρίων, όπως είναι η αμπικιλίνη, οι τετρακυκλίνες, η ερυθρομυκίνη και η γενταμικίνη. Τα παραπάνω αντιβιοτικά είναι αυτά που χρησιμοποιούνται συνήθως για την καταπολέμηση των *Listeria* spp. στην καθημερινή κτηνιατρική και ιατρική πράξη (Teuber, 1999). Μέχρι το 1988, οπότε και καταγράφηκαν τα πρώτα ανθεκτικά και πολυανθεκτικά στελέχη, δεν είχε αναφερθεί καμία περίπτωση επίκτητης ανθεκτικότητας της *L. monocytogenes* στα αντιβιοτικά (Aarestrup, 2006). Έκτοτε έχουν γίνει πολλές αναφορές για την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά της *L. monocytogenes* που έχει απομονωθεί από διάφορες πηγές (Antunes και συν., 2002; Para και συν., 1996; Tsakris και συν., 1997; Yucel και συν., 2005). Όπως αναφέρεται από τους Charpentier και συν. (1995), η ανθεκτικότητα των *Listeria* spp. αποδίδεται στην ενσωμάτωση κινητών γενετικών στοιχείων, όπως είναι τα αυτομεταβιβαζόμενα κινητά πλασμίδια (self-transferable, mobilizable plasmids) και τα συζευγμένα μεταθετόνια (conjugative transposons). Η εμφάνιση της ανθεκτικότητας της *L. monocytogenes* στα αντιβιοτικά μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία.

Η παρουσία λιστεριών στο ορνίθειο κρέας έχει τεκμηριωθεί σε πολλές χώρες (EFSA, 2010), αλλά η ύπαρξη του στο ελληνικό ορνίθειο κρέας δεν έχει

ερευνηθεί εκτενώς. Οι στόχοι της παρούσας έρευνας ήταν να διερευνηθεί το επίπεδο των *Listeria* spp. και ο επιπολασμός της *L. monocytogenes* στα σφάγια ορνιθίων της Βόρειας Ελλάδας και να αξιολογηθεί η ανθεκτικότητα των στελεχών της σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

3.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.1 Δειγματοληψία

Τέσσερα διαφορετικά πτηνοσφαγεία της Β. Ελλάδας (τα οποία και πλέον θα αναφέρονται ως πτηνοσφαγείο 1, 2, 3, 4) επιλέχθηκαν για την διενέργεια της παρούσας μελέτης. Το ένα από αυτά (πτηνοσφαγείο 3) ήταν σύγχρονο με εξοπλισμό τελευταίας τεχνολογίας, ενώ τα υπόλοιπα τρία (πτηνοσφαγείο 1, 2, 4) ήταν παραδοσιακού τύπου, καλύπτοντας ωστόσο όλες τις ισχύουσες νομοθετικές απαιτήσεις.

Τα δείγματα ήταν τεμάχια δέρματος τραχήλου που λαμβάνονταν από σφάγια ορνιθίων αμέσως μετά τη σφαγή τους (ISO 17604:2003). Η περιοχή του τραχήλου θεωρείται ότι είναι περισσότερο επιβαρυνμένη από μικροβιολογικής απόψεως, λόγω του τρόπου ανάρτησης των σφαγίων κατά τη διαδικασία της σφαγής (Colin και Corry, 1999).

Τεμάχιο βάρους 10 g περίπου δέρματος τραχήλου λαμβάνονταν από κάθε σφάγιο. Τα τεμάχια δέρματος από τρία σφάγια ομογενοποιούνταν πριν την εξέταση προκειμένου να σχηματίσουν το τελικό δείγμα των 25 g (ISO 17604:2003). Εξετάστηκαν συνολικά 100 δείγματα (300 σφάγια) για την παρουσία ή απουσία *Listeria* spp και *Listeria monocytogenes*.

Επιπλέον, 40 δείγματα ελήφθησαν από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων με τη μέθοδο των βυσμάτων. Τα σημεία δειγματοληψίας περιελάμβαναν επιφάνεια: α) 8 πάγκων επεξεργασίας των σφαγίων αμέσως μετά την ψύξη τους, β) 8 άδειων πλαστικών περιεκτών, γ) 8 γεμάτων με σφάγια πλαστικών περιεκτών, δ) 8 χειρολαβών των ψυγείων και ε) 8 πάγκων

κοπής των φιλέτων. Η απόμαξη αφορούσε 100 cm² επίπεδης επιφάνειας και ολόκληρες τις χειρολαβές των ψυγείων και επαναλαμβάνονταν 2-5 φορές με τη χρήση αποστειρωμένου βαμβακοφόρου στείλεου. Πριν από την απόμαξη, τα βύσματα υγραίνονταν σε διάλυμα Half Fraser και μετά από αυτήν, μεταφέρονταν σε φιαλίδια που περιείχαν 10 ml του ίδιου υποστρώματος. Ακολουθούσε απόμαξη της ίδιας επιφάνειας με στεγνό βύσμα, το οποίο μεταφέρονταν στο ίδιο φιαλίδιο. Οι 2-5 απομάξεις σχημάτιζαν ένα δείγμα.

Τα δείγματα μεταφέρονταν εντός μίας ώρας στο εργαστήριο μέσα σε ισοθερμικούς περιέκτες με πάγο και εξετάζονταν άμεσα.

3.3.2 Απομόνωση των *Listeria spp.* και *L. monocytogenes*

Η απομόνωση των Λιστεριών γινόταν σύμφωνα με τη μέθοδο που καθορίζει η Διεθνής Σταθερά EN/ISO 11290-1:1996/FDAM 1:2004(E). Συγκεκριμένα, 25 g δείγματος αναμιγνύονταν με τον προεμπλουτιστικό ζωμό Half Fraser (225ml), ομογενοποιούνταν σε πλαστικούς σάκους σε συσκευή Stomacher (Stomacher 400 – laboratory blender, Seward Medical, London, UK) για 2 min και επωάζονταν στους 30°C για 24 ώρες. Οι βαμβακοφόροι στείλεοί εμβαπτίζονταν απευθείας στον προεμπλουτιστικό ζωμό Half Fraser και επωάζονταν επίσης στους 30°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια ενοφθαλμιζονταν 10 ml από την κάθε καλλιέργεια Half Fraser στα εκλεκτικά υποστρώματα Agar *Listeria Ottavani* and *Agosti* (ALOA, Biolife, Milano, Italy) και Oxford agar και οι αποικίες εξετάζονταν μετά από επώαση στους 37°C για 24 και 48 ώρες. Παράλληλα, μία ποσότητα (0,1 ml) από την κάθε καλλιέργεια με Half Fraser ενοφθαλμιζονταν σε 10 ml εκλεκτικού εμπλουτιστικού ζωμού Fraser και επωάζονταν στους 37°C για 48 ώρες. Ακολούθως, ενοφθαλμιζονταν 10 ml από την κάθε καλλιέργεια Fraser στα εκλεκτικά υποστρώματα ALOA και Oxford agar και οι αποικίες εξετάζονταν μετά από επώαση στους 37°C για 24 και 48 ώρες. 5 χαρακτηριστικές αποικίες *Listeria spp.* λαμβάνονταν από κάθε στερεό εκλεκτικό υπόστρωμα και καθαροποιούνταν σε Tryptone Soya Yeast Extract agar μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες.

Όλα τα υποστρώματα και οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από τη Merck KGaA (Darmstadt, Germany) εκτός και αν επισημαίνεται διαφορετικά.

3.3.3 Ταυτοποίηση και Γενετική Υποτυποποίηση της *L. monocytogenes*

Οι καθαροποιημένες αποικίες των *Listeria* spp. ταυτοποιούνταν με τη χρήση εξειδικευμένων για το γένος και το είδος εκκινητών (primers) με τη μέθοδο της πολλαπλής Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (multiplex PCR) που περιγράφεται από τους Lawrence και Gilmour (1994). Χρησιμοποιήθηκαν 3 ζεύγη εκκινητών (primers U1-U2, LI1-U1, LM1-LM2) από τα οποία το πρώτο αναγνωρίζει την ύπαρξη βακτηριακού DNA, το δεύτερο των *Listeria* spp και το τρίτο της *L. monocytogenes*.

Πενήντα πέντε στελέχη (τουλάχιστον ένα στέλεχος από κάθε θετικό δείγμα, συμπεριλαμβάνοντας και τα δείγματα από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων) *L. monocytogenes* τυποποιήθηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο της ανάλυσης τυχαίως πολλαπλασιασθέντων πολυμορφικών DNA (Random Amplified Polymorphic DNA analysis, RAPD) (van Belkum και συν., 1993). Η τεχνική αυτή δημιουργεί αποτυπώματα (fingerprints) του DNA με πολλαπλασιασμό τυχαίων τεμαχίων του DNA. Ο αριθμός και το μέγεθος αυτών των τεμαχίων αποτελεί τη βάση για την τυποποίηση των στελεχών. Οι εικόνες των πηκτών που προέκυψαν αναλύθηκαν με το πρόγραμμα της BioNumerics (Applied Maths, NV) και κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δέντρο.

3.3.4 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες της *L. monocytogenes*

Πενήντα πέντε στελέχη *L. monocytogenes* ελέγχθηκαν για την ευαισθησία τους σε μια ομάδα 20 αντιμικροβιακών παραγόντων. Τα προφίλ αντιμικροβιακής ευαισθησίας των στελεχών καθορίστηκαν με τη μέθοδο της διάχυσης των δίσκων σε τρυβλία Mueller-Hinton agar, σύμφωνα με τις οδηγίες

του Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; πρώην NCCLS) (NCCLS, 2004). Τα αντιμικροβιακά δισκία (BBL) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν (συγκέντρωση σε μικρογραμμάρια ανά δισκίο): αμοξικιλίνη (25 µg), αμπικιλίνη (10 µg), κεφοταξίμη (30 µg), κεφαλοτίνη (30 µg), χλωραμφαινικόλη (30 µg), σιπροφλοξακίνη (5 µg), κλινδαμυκίνη (2 µg), ενροφλοξακίνη (5 µg), ερυθρομυκίνη (15 µg), γενταμικίνη (10 µg), καναμυκίνη (30 µg), ναλιδιξικό οξύ (30 µg), νεομυκίνη (30 µg), οξολινικό οξύ (2 µg), οξυτετρακυκλίνη (30 µg), πενικιλίνη (10 U), στρεπτομυκίνη (10 µg), σουλφομεθοξαζόλη και τριμεθοπρίμη (23,75/1,25 µg), τετρακυκλίνη (30 µg) και βανκομυκίνη (30 µg). Επειδή επί του παρόντος δεν παρέχονται αριθμητικά κριτήρια από το CLSI για τις *Listeria* spp., με εξαίρεση τα όρια ευαισθησίας για την αμπικιλίνη και την πενικιλίνη, χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα κριτήρια που δίνονται από το CLSI για τον Σταφυλόκοκκο. Τα στελέχη *E. coli* ATCC 25922 και *S. aureus* ATCC 29213 χρησιμοποιήθηκαν ως στελέχη αναφοράς για την παρούσα έρευνα.

3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.4.1 Παρουσία των *Listeria* spp. και της *L. monocytogenes* στα σφάγια ορνιθίων

Στελέχη *Listeria* spp. απομονώθηκαν σε 99 από τα 100 δείγματα που εξετάσαμε (99%), ενώ *Listeria monocytogenes* σε 38 από τα εξετασθέντα δείγματα (38%). Ο παρατηρούμενος επιπολασμός της *L. monocytogenes* στα σφάγια ορνιθίων κυμάνθηκε από 16% (πτηνοσφαγείο 1) έως 60% (πτηνοσφαγείο 4). Αναλυτικά τα αποτελέσματα που αφορούν τον επιπολασμό των *Listeria* spp. και της *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων σε τέσσερα πτηνοσφαγεία της Β. Ελλάδας φαίνονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα του επιπολασμού των *Listeria* spp. και της *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων

	Αριθμός δειγμάτων 3 σφάγια / δείγμα	Αριθμός και ποσοστό θετικών για <i>Listeria</i> spp.	Αριθμός και ποσοστό θετικών για <i>L. monocytogenes</i>
Πτηνοσφαγείο 1	25	25 (100)	4 (16)
Πτηνοσφαγείο 2	25	24 (96)	9 (36)
Πτηνοσφαγείο 3	25	25(100)	10 (40)
Πτηνοσφαγείο 4	25	25 (100)	15 (60)
Σύνολο	100	99 (99)	38 (38)

3.4.2 Παρουσία των *Listeria* spp. και της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων

Listeria spp. απομονώθηκαν από το περιβάλλον όλων των πτηνοσφαγείων ενώ *L. monocytogenes* εντοπίστηκε μόνο στο πτηνοσφαγείο 4. Τα αναλυτικά αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα της παρουσίας των *Listeria* spp. και της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων.

	Χειρολαβές ψυγείων		Περιέκτες με σφάγια		Κενοί περιέκτες		Επιφάνεια επεξεργασίας		Επιφάνεια φιλετοποίησης	
	Δ 1*	Δ 2*	Δ 1	Δ 2	Δ 1	Δ 2	Δ 1	Δ 2	Δ 1	Δ 2
Πτηνοσφαγείο 1	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
Πτηνοσφαγείο 2	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
Πτηνοσφαγείο 3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Πτηνοσφαγείο 4	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+

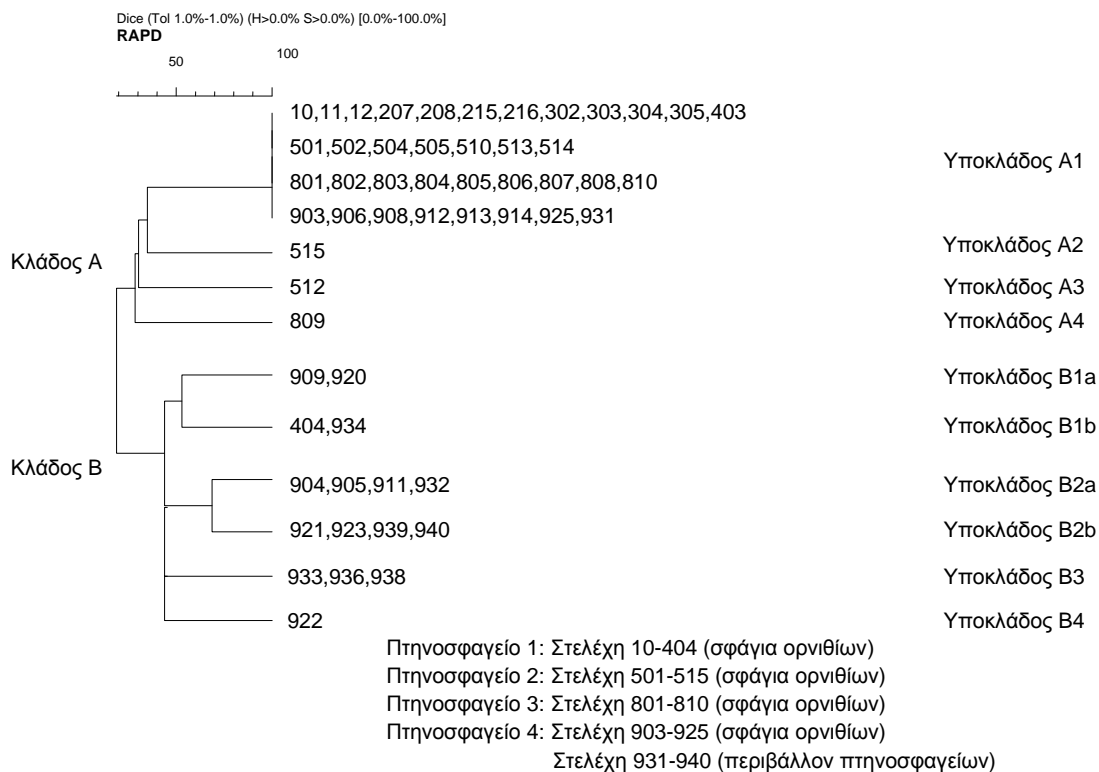
- : απουσία *Listeria* spp., + : παρουσία *Listeria* spp., +*: παρουσία *L. monocytogenes*

Δ 1*: Δείγμα 1, Δ 2*: Δείγμα 2

3.4.3 Γενετική υποτυποποίηση των στελεχών *L. monocytogenes*

Σύμφωνα με την ανάλυση που προέκυψε με τη μέθοδο RAPD, τα 55 στελέχη *L. monocytogenes* κατηγοριοποιήθηκαν σε 2 κλάδους (A-B) και κάθε κλάδος χωρίστηκε σε υποκλάδους (A1-A4, B1a, B1b, B2a, B2b, B3, B4). Η πλειοψηφία των στελεχών της *L. monocytogenes* βρέθηκε να ανήκει στον κλάδο A (39 από 55) και πιο συγκεκριμένα στον υποκλάδο A1 (36 από 55). Οι υπόλοιποι κλάδοι αποτελούνταν από μικρότερο αριθμό στελεχών (1 έως 4). Το φυλογενετικό δέντρο που σχηματοποιήθηκε απεικονίζεται στο γράφημα 3.1.

Γράφημα 3.1: Φυλογενετικό δέντρο των στελεχών *L. monocytogenes* με τη μέθοδο RAPD.



3.4.4 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των στελεχών *L. monocytogenes*

Όλα τα στελέχη *L. monocytogenes* βρέθηκαν ανθεκτικά σε 2 αντιμικροβιακούς παράγοντες (οξολινικό και ναλιδιξικό οξύ). Τα περισσότερα στελέχη βρέθηκαν επίσης ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη (46 από 55) και ορισμένα μόνο στην τετρακυκλίνη (7 από 55) και οξυτετρακυκλίνη (5 από 55) (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα τους ελέγχου ευαισθησίας των στελεχών *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων στους αντιμικροβιακούς παράγοντες

Αντιμικροβιακοί παράγοντες (μg)	Ανθεκτικά (%)	Ενδιάμεσα (%)	Ευαίσθητα (%)
αμοξικιλίνη (25)	0	0	100
αμπικιλίνη (10)	0	0	100
βανκομυκίνη (30)	0	0	100
γενταμικίνη (10)	0	0	100
ενροφλοξακίνη (5)	0	0	100
ερυθρομυκίνη (15)	0	0	100
καναμυκίνη (30)	0	0	100
κεφαλοτίνη (30)	0	0	100
κεφοταξίμη (30)	0	15	85
κλινδαμυκίνη (2)	84	0	16
ναλιδιξικό οξύ (30)	100	0	0
νεομυκίνη (30)	0	0	100
οξολινικό οξύ (2)	100	0	0
οξυτετρακυκλίνη (30)	9	0	91
πενικιλίνη (10 U)	0	0	100
σιπροφλοξακίνη (5)	0	0	100
σουλφομεθοξαζόλη/ τριμεθοπρίμη (23,75/1,25)	0	0	100
στρεπτομυκίνη (10)	0	0	100
τετρακυκλίνη (30)	13	0	87
χλωραμφαινικόλη (30)	0	0	100

3.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.5.1 Παρουσία των *Listeria* spp. και *L. monocytogenes* στα σφάγια και στο περιβάλλον των πτηνοσφαγείων

Από τη δική μας έρευνα φαίνεται ότι τα σφάγια των ορνιθίων είναι σε μεγάλο βαθμό μολυσμένα με λιστέριες. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας δείχνουν ότι το 99% των σφαγίων ορνιθίων που εξετάσαμε βρέθηκαν μολυσμένα με *Listeria* spp. και το 38% με *L. monocytogenes* και συμφωνούν με τα αντίστοιχα που αναφέρονται για την Πορτογαλία από τους Antunes και συν. (2002), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι όλα τα δείγματα ορνίθιου κρέατος που εξέτασαν βρέθηκαν μολυσμένα με *Listeria* spp. και το 41% με *L. monocytogenes*. Παρομοίως, σε άλλες δύο έρευνες που έγιναν στην Ισπανία από τους Carita και συν. (2000) και Vitas και συν. (2004) βρέθηκε ότι το 95% και 76,3%, αντιστοίχως, των διατιθέμενων σε λιανική πώληση ορνιθίων ήταν μολυσμένα με *Listeria* spp. και το 32% και 36,1%, αντιστοίχως, με *L. monocytogenes*. Επιπροσθέτως, σε μια πρόσφατη έρευνα που διενεργήθηκε στην Ιταλία από τους Pesavento και συν. (2010) το ποσοστό της *L. monocytogenes* που βρέθηκε σε ορνίθιο κρέας ήταν 24,5%. Χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης της *L. monocytogenes* σε ορνίθιο κρέας, που κυμαίνονταν από 4,3% έως 18%, έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες χώρες όπως είναι η Κορέα (Beak και συν., 2000), η Πολωνία (Kosek-Paszowska και συν., 2005), το Βέλγιο (Uyttendaele και συν., 1997), το Πακιστάν (Mahmood και συν., 2003), η Τουρκία (Yusel και συν., 2005), η Νέα Ζηλανδία (Hudson και συν., 1992) και η Βόρεια Ιρλανδία (Soultos και συν., 2003). Υψηλότερα ποσοστά μόλυνσης, που κυμαίνονταν από 47% έως 75%, έχουν καταγραφεί στη Δανία (Skovgaard και Morgen, 1988), στη Νορβηγία (Rorvik και Yndestad, 1991), στη Φινλανδία (Miettinen και συν., 2001) και στην Εσθονία (Praakle-Amin και συν., 2006).

Στην Ελλάδα, σε έρευνα των Πανούλη και συν. (1990), που αφορούσε τη διερεύνηση της παρουσίας της *L. monocytogenes* σε σφάγια πουλερικών κατά τα διάφορα στάδια της προετοιμασίας τους, καθώς και σε σφάγια που

κυκλοφορούσαν στο εμπόριο, απομονώθηκαν *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *L. innocua* και *L. welshimeri* σε ποσοστά 71,7%, 38,5%, 51,3% και 1,6%, αντιστοίχως. Σε έρευνα της Παπά (1996), που αφορούσε νωπά κοτόπουλα, που προέρχονταν από διάφορα καταστήματα λιανικής πώλησης τροφίμων της Θεσσαλονίκης ή από το Νοσοκομείο Ειδικών Παθήσεων Θεσσαλονίκης και προορίζονταν για τη σίτιση των ασθενών και του προσωπικού του νοσοκομείου, βρέθηκαν μολυσμένα με *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, και *L. innocua* σε ποσοστά 63,6%, 36,3% και 27,3%, αντιστοίχως.

Η παρουσία της *L. monocytogenes* στα σφάγια των ορνιθίων που διατίθενται στο λιανικό εμπόριο σχετίζεται κυρίως με τις περιβαλλοντικές επιμολύνσεις που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τους (Antunes και συν., 2002). Σε μια έρευνα που διενεργήθηκε από τους Ojieniyi και συν. (1996) δεν διαπιστώθηκε η παρουσία της *L. monocytogenes* στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι η μόλυνση των ορνιθίων κρεοπαραγωγής με *L. monocytogenes* εντοπίζεται στα πτηνοσφαγεία και ότι η μόλυνση των προϊόντων από ορνίθιο κρέας οφείλεται πιθανότατα σε μεταφορά της *L. monocytogenes* σε αυτά από περιβαλλοντικές πηγές παρά σε επιμόλυνση από ορνίθια φορείς του μικροοργανισμού. Επιπλέον, οι Lawrence και Gilmour (1994) υποστήριξαν ότι η μεγάλη συχνότητα απομόνωσης της *L. monocytogenes* από επιφάνειες του περιβάλλοντος χώρου των εγκαταστάσεων επεξεργασίας τροφίμων, που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, μπορεί να οφείλεται είτε στη μόλυνση των επιφανειών από εσωτερικούς παράγοντες όπως π.χ. από την παραγωγή αερολυμάτων κατά τη διαδικασία καθαρισμού, είτε στην αδυναμία θανάτωσης του μικροοργανισμού κατά τη διαδικασία του καθαρισμού και της απολύμανσης, είτε στην ικανότητα του να επιβιώνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα κάτω από τις συνθήκες που επικρατούν στις περισσότερες εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων.

Ωστόσο, τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από τη δική μας έρευνα δεν μπορούν να υποστηρίξουν πλήρως τα ευρήματα και τις απόψεις των παραπάνω ερευνητών. Το πτηνοσφαγείο 4 ήταν το μοναδικό που οι

επιφάνειες του ήταν μολυσμένες με *L. monocytogenes*. Το βακτήριο απομονώθηκε από τις χειρολαβές των ψυγείων, από τους πλαστικούς περιέκτες που χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση των σφαγίων στο ψυγείο (είτε περιείχαν σφάγια, είτε ήταν άδειοι), από την επιφάνεια επεξεργασίας αμέσως μετά την ψύξη και από τους πάγκους κοπής των φιλέτων. Το συγκεκριμένο πτηνοσφαγείο ήταν αυτό με το μεγαλύτερο ποσοστό μόλυνσης με *L. monocytogenes* (60%) στα σφάγια. Προφανώς η παρουσία της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον του πτηνοσφαγείου οδήγησε σε μεγαλύτερο ποσοστό μόλυνσης και των σφαγίων. Ωστόσο τα σφάγια από τα άλλα τρία πτηνοσφαγεία βρέθηκαν επίσης μολυσμένα με *L. monocytogenes* (16%, 36% και 40% για τα πτηνοσφαγεία 1, 2 και 3, αντιστοίχως) αν και δεν απομονώθηκε ο μικροοργανισμός από τις επιφάνειές τους. Η εκτίμηση μας είναι ότι υπάρχει μια αλληλεπίδραση μεταξύ των σφαγίων και του περιβάλλοντος του πτηνοσφαγείου. Ένα μολυσμένο σμήνος ορνιθίων είναι δυνατό να εισάγει τη *L. monocytogenes* στο σφαγείο και να επιμολύνει τις επιφάνειές του. Η εφαρμογή ενός ανεπαρκούς προγράμματος καθαρισμού και απολύμανσης δίνει τη δυνατότητα στο μικροοργανισμό να εγκατασταθεί σε διάφορες επιφάνειες του εξοπλισμού της γραμμής σφαγής και επομένως να επιμολύνει τα σφάγια και τα προϊόντα κρέατος που προέρχονται από σμήνη πουλερικών που είναι απαλλαγμένα από *L. monocytogenes*. Η εξέταση διαφορετικών δειγμάτων από το ίδιο σμήνος από κάθε στάδιο της σφαγής, πιθανόν να μπορούσε να διευκρινίσει επακριβώς τις οδούς επιμόλυνσης των σφαγίων.

3.5.2 Γενετική υποτυποποίηση των στελεχών *L. monocytogenes*

Η εκτίμηση μας επαληθεύεται και από τα αποτελέσματα της ανάλυσης RAPD. Ο υποκλάδος A1 περιείχε 36 στελέχη που προέρχονταν από όλα τα πτηνοσφαγεία που εξετάσαμε: 12 στελέχη από το πτηνοσφαγείο 1, 7 από το πτηνοσφαγείο 2, 9 από το πτηνοσφαγείο 3 και 8 από το πτηνοσφαγείο 4, υποδηλώνοντας ότι το συγκεκριμένο στέλεχος της *L. monocytogenes* ήταν το επικρατέστερο, καθώς ήταν το πιο συχνά εμφανιζόμενο και στα 4 πτηνοσφαγεία. Όπως αναφέρεται από τους Autio και συν. (2002), ορισμένα

στελέχη είναι πιο διαδεδομένα στη φύση και επομένως είναι πιο εύκολο να μολύνουν τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων μέσω των πρώτων υλών. Αν και υπάρχει ένα ευρύ φάσμα στελεχών *L. monocytogenes* που υπάρχουν στη φύση και επομένως και στις πρώτες ύλες, ορισμένα μόνο στελέχη μπορούν να προκαλέσουν εμμένουσα λοίμωξη. Τα στελέχη αυτά προφανώς χαρακτηρίζονται από αυξημένη ικανότητα προσκόλλησης στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα και αυξημένη ανθεκτικότητα στις απολυμαντικές ουσίες, και κατά συνέπεια έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται και να επιβιώνουν στο περιβάλλον των εγκαταστάσεων προκαλώντας επιμολύνσεις στα προϊόντα που παράγονται.

Όλα τα στελέχη του κλάδου A προέρχονταν από σφάγια ορνιθίων εκτός από ένα. Το μοναδικό στέλεχος του κλάδου A που προερχόταν από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων ήταν το 931, το οποίο απομονώθηκε από τις χειρολαβές των ψυγείων. Στην περίπτωση αυτή πιθανότατα τα σφάγια μόλυναν τα χέρια των εργαζομένων και τελικά τις χειρολαβές των ψυγείων. Τα υπόλοιπα στελέχη που προέρχονταν από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων ανήκαν στον κλάδο B. Ο κλάδος B αποτελούνταν αποκλειστικά από στελέχη που προέρχονταν από το πτηνοσφαγείο 4 (σφάγια και επιφάνειες) και μόνο ένα στέλεχος (404) προερχόταν από το πτηνοσφαγείο 2. Πανομοιότυπα στελέχη βρέθηκαν στα σφάγια ορνιθίων και στις επιφάνειες του πτηνοσφαγείου 4 και ήταν προφανώς η περιβαλλοντική μόλυνση που προκάλεσε τη μόλυνση και των σφαγίων. Αυτή η εκτίμηση υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι το πτηνοσφαγείο 4 εφαρμόζε το λιγότερο εντατικό πρόγραμμα καθαρισμού και απολύμανσης, το οποίο και έδινε τη δυνατότητα στα στελέχη της *L. monocytogenes* να αποικίσουν τις επιφάνειες και να σχηματίσουν ένα δυναμικό μικροαποικιακό περιβάλλον, προκαλώντας επιμόλυνση των σφαγίων.

3.5.3 Έλεγχος της ευαισθησίας σε αντιμικροβιακούς παράγοντες των στελεχών *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων

Επειδή τις τελευταίες δεκαετίες έχει γίνει κοινώς αποδεκτό ότι η λιστερίωση είναι πρωτίστως τροφιμογενής λοίμωξη και ότι η *L. monocytogenes* γίνεται προοδευτικά ανθεκτικότερη στα αντιβιοτικά, η ευαισθησία και οι φαινότυποι ανθεκτικότητας των τροφιμογενών στελεχών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* στους αντιμικροβιακούς παράγοντες δεν είναι ιδιαίτερα ισχυρή. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία της ανθρώπινης λιστερίωσης. Τα απομονωθέντα στελέχη βρέθηκαν ευαίσθητα στα αντιβιοτικά πρώτης επιλογής (αμπικιλίνη και γενταμικίνη) και στην τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη που χρησιμοποιείται ως δεύτερης επιλογής, ιδιαίτερα σε ασθενείς που είναι αλλεργικοί στις πενικιλίνες (Charpentier και συν., 1995). Όλα τα στελέχη βρέθηκαν επίσης ευαίσθητα στη βανκομυκίνη και ερυθρομυκίνη, που χρησιμοποιούνται αντιστοίχως για τη θεραπεία της βακτηριαιμίας και σε έγκυες γυναίκες στις οποίες έχει διαγνωσθεί λιστερίωση (Charpentier και Courvalin, 1999). Επιπλέον, με την εξαίρεση ενός μικρού ποσοστού στελεχών (13%) που βρέθηκαν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη, τα στελέχη της *L. monocytogenes* βρέθηκαν ευαίσθητα στην αμπικιλίνη και στην τετρακυκλίνη που συνιστώνται για τη θεραπεία της λοίμωξης στα ζώα (Aarestrup, 2006). Περιέργως, υψηλό ποσοστό των στελεχών (85%) βρέθηκε ευαίσθητο στη κεφοταξίμη και όλα τα στελέχη στη κεφαλοτίνη. Τα στελέχη των *Listeria* spp. έχει αναφερθεί ότι είναι φυσικά ανθεκτικά ή σχετικά ανθεκτικά στις περισσότερες σύγχρονες κεφαλοσπορίνες (Troxler και συν., 2000).

Στην παρούσα έρευνα, τα στελέχη της *L. monocytogenes* βρέθηκαν να είναι ανθεκτικά στο ναλιδιξικό οξύ (100%), οξολινικό οξύ (100%), στη κλινδαμυκίνη (84%) και μερικώς στην τετρακυκλίνη (13%) και οξυτετρακυκλίνη (9%). Η ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* στο ναλιδιξικό οξύ είναι ευρέως γνωστή (Yucel και συν., 2005; Liu, 2008). Οι Troxler και συν. (2000)

παρατήρησαν ότι οι Λιστέριες είναι φυσικά ανθεκτικές σε πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους οποίους περιλαμβάνονται και οι μη φθοριομένες κινολόνες. Το ναλιδιξικό οξύ, μια κινολόνη που έχει αναγνωρισθεί ότι έχει ανασταλτικές ιδιότητες έναντι πολλών Gram αρνητικών βακτηρίων, είναι ένας από τους πιο συχνούς αντιμικροβιακούς παράγοντες που προσθέτονται στους πρωτεύοντες και δευτερεύοντες εμπλουτιστικούς ζυμούς για την απομόνωση των *Listeria* spp. (Liu, 2008). Όσον αφορά τη φυσική ανθεκτικότητα ή ευαισθησία του οξολινικού οξέως, το οποίο είναι επίσης κινολόνη, δεν υπάρχουν επαρκή βιβλιογραφικά δεδομένα. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι το οξολινικό οξύ έχει καταχωρηθεί για χρήση στην παραγωγή των πουλερικών για τη θεραπεία της κολιβακίλωσης.

Σε αντίθεση με την ευαισθησία των *Listeria* spp. στην κλινδαμυκίνη που παρατηρήθηκε σε μια έρευνα των Troxler και συν. (2000), το 84% των στελεχών της *L. monocytogenes* που απομονώθηκαν στην έρευνα μας ήταν ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη. Υψηλή ανθεκτικότητα στην κλινδαμυκίνη (54%) παρατήρησαν και οι Antunes και συν. (2002), ενώ και οι Lyon και συν. (2008) ανέφεραν ότι το 27% των *L. monocytogenes*, που προέρχονταν από δείγματα πουλερικών, εμφάνιζαν μέτρια ανθεκτικότητα σε αυτό το αντιβιοτικό. Παρομοίως, άλλοι ερευνητές (Conter και συν., 2009; Davis και Jackson, 2009; Harakeh και συν., 2009; Pesavento και συν., 2010) βρήκαν ποικίλα ποσοστά ανθεκτικότητας της *L. monocytogenes* στην κλινδαμυκίνη (8%, 21%, 45% και 27,5%, αντιστοίχως). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι Conter και συν. (2009) παρατήρησαν ότι όλα τα στελέχη που ήταν ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη προέρχονταν από τα τρόφιμα και όχι από το περιβάλλον των εγκαταστάσεων. Το εύρημα αυτό έρχεται σε μερική συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα καθώς μόνο 2 ανθεκτικά στελέχη προέρχονταν από τις επιφάνειες του πτηνοσφαγείου και τα υπόλοιπα 44 στελέχη προέρχονταν από τα σφάγια. Αυτά τα δύο στελέχη ήταν τα 931 και 932, που προέρχονταν από δείγματα που ελήφθησαν από τις χειρολαβές των ψυγείων και όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ήταν προφανώς τα σφάγια που επιμόλυναν τα χέρια των εργαζομένων και τελικά τις χειρολαβές των ψυγείων.

Ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ των στελεχών της *L. monocytogenes* (13%) που απομονώθηκαν στην παρούσα έρευνα. Οι Antunes και συν. (2002) υποστήριξαν ότι κανένα από τα στελέχη της *L. monocytogenes* δεν ήταν ανθεκτικό στην τετρακυκλίνη, ενώ ορισμένοι ερευνητές (Conter και συν., 2009; Lyon και συν., 2008, Pesavento και συν., 2010) ανέφεραν πολύ χαμηλά ποσοστά ανθεκτικότητας της *L. monocytogenes* (1,6%, 3% και 2,5% αντιστοίχως). Αντιθέτως, άλλοι ερευνητές (Arslan και Ozdemir, 2008; Harakeh και συν., 2009) ανέφεραν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας (38,3% και 20% αντιστοίχως). Σε άλλες έρευνες που αφορούσαν στελέχη *Listeria* spp. και περιελάμβαναν και *L. monocytogenes*, η ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη ήταν μία από τις πιο συχνές παρατηρούμενες περιπτώσεις ανθεκτικότητας (Charpentier και συν., 1995; Charpentier και Courvalin, 1999; Franco και συν., 1994; Harakeh και συν., 2009). Η εκτεταμένη χρήση της τετρακυκλίνης, και ιδιαίτερα στις ζωοτροφές, ευθύνεται για την σχετικά υψηλή ανθεκτικότητα σε αυτή των *Listeria* spp..

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας φανερώνουν έναν υψηλό επιπολασμό της *L. monocytogenes* σε σφάγια ορνιθίων που προέρχονταν από πτηνοσφαγεία της Βόρειας Ελλάδας. Η βελτίωση της αποτελεσματικότητας των προγραμμάτων καθαριότητας και η αυξημένη προσοχή στην εφαρμογή των κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής μπορεί να μειώσει σημαντικά το ποσοστό μόλυνσης των σφαγίων και των προϊόντων τους. Ταυτόχρονα, η κατάλληλη θερμική επεξεργασία των προϊόντων από ορνίθιο κρέας και η χρήση των ενδεδειγμένων πρακτικών υγιεινής μπορούν να ελαχιστοποιήσουν την πιθανότητα εμφάνισης ανθρώπινης λιστερίωσης τροφιμογενούς προελεύσεως. Όσον αφορά την ανθεκτικότητα των αντιβιοτικών, όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν βρέθηκαν ευαίσθητα στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία της λιστερίωσης. Ωστόσο, η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στην κλινδαμυκίνη και τετρακυκλίνη δεν μπορεί να αποκλείσει την πιθανότητα να εμφανιστεί μελλοντικά και σε άλλα αντιβιοτικά με αποτέλεσμα να ανατραπεί η σημερινή

κατάσταση της αποτελεσματικής θεραπείας της λιστερίωσης με σοβαρές επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία.

3.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aarestrup, F. M. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press, Washington, USA, pp. 256.
- Antunes, P., Reu, C., Sousa, J. C., Pestana, N. and Peixe, L. 2002. Incidence and Susceptibility to Antimicrobials Agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* Isolated from Poultry Carcasses in Porto, Portugal. Journal of Food Protection 65 (12), 1888-1893.
- Arslan, S. and Ozdemir, F. 2008. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. Food Control 19, 360-363.
- Autio, T., Lunden, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Bjorkroth, J., Sjoberg, A.-M. and Korkeala, H. 2002. Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. International Journal of Food Microbiology 77, 83-90.
- Beak, S.Y., Lim, Y.S., Lee, D.H., Min, K.H., Kim, C.M. 2000. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea. Journal of Food Protection 63, 186-189.
- Belkum van, A., Struelens, M. and Quint, W. 1993. Typing of *Legionella pneumophila* Strains by Polymerase Chain Reaction-Mediated DNA Fingerprinting. Journal of Clinical Microbiology 31(8), 2198-2200.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. and Garcia-Fernandez, M.C. 2001. Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. International Journal of Food Microbiology 65, 75-82.

- Ceylan, Z.G., Demirkaya, A.K. and Adiguzel, G. 2008. Incidence of *Listeria monocytogenes* in retail chicken meat and establishing relationship with some bacteria by logistic regression. *Journal of Food Quality* 31, 121-130.
- Charpentier, E., and Courvalin P. 1999. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 2103-2108.
- Charpentier, E., Gerbaud G., Jacquet, C., Rocourt, J. and Courvalin, P. 1995. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *Journal of Infectious Diseases* 172, 277-281.
- Colin, P., and Corry, J.E.L (eds). 1999. Developments in Microbial Methods. In "Microbial Control in the Meat Industry". A Flair Flow Europe Training Workshop. RE.TU.ER. Northern Ireland, 158-181.
- Conter, M., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A. and Ianieri, A. 2009. Characterisation of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 128, 497-500.
- Davis, J.A. and Jackson C.R. 2009. Comparative Antimicrobial Susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. *Microbial Drug Resistance* 15(1), 27-32.
- De Cesare, A., Manfreda, G., Macri, M. and Cantoni, C. 2006. Application of automated ribotyping to support the evaluation of the *Listeria monocytogenes* source in a Taleggio producing plant and to predict the risk human health linked to the accidental sale of contaminated cheese, *Archivio Veterinario Italiano* 57, 231-240.
- Doganay, M. 2003. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunological Medical Microbiology* 35, 173-175.
- EFSA Anonymous. 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in European Union in 2008. *EFSA J.* 8:1496, 3-313.

- Farber, J.M. and Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiological Reviews* 55, 476-511.
- Fenlon, D.R., Wilson, J. and Donachie, W. 1996. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 641-650.
- Franco, C.M., Quinto, E.J., Fente, C., Rodriguez-Otero, J.L., Dominguez, L. and Cepeda, A. 1994. Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, 1655-1657.
- Franco, C.M., Quinto, E.J., Fente, C., Rodriguez-Otero, J.L., Dominguez, L. and Cepeda, A. 1995. Determination of the principal sources of *Listeria* spp. contamination in poultry meat and a poultry processing plant. *Journal of Food Protection* 58, 1320-1325.
- Gandhi, M. and Chikindas, M.L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113, 1-15.
- Genigeorgis, C.A., Dutulescu, D. and Garayzabal, J.F. 1989. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. *Journal of Food Protection* 52, 618-624.
- Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E. Bardour, E. and Alwan, N. 2009. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Science of the Total Environment* 407, 4022-4027.
- Hudson, W.R. and Mead, G.C. 1989. *Listeria* contamination at a poultry processing plant. *Letters of Applied Microbiology* 9, 211-214.
- Hudson, J.A., Mott, S.J., Delacy, K.M. and Edridge, A.L. 1992. Incidence and coincidence of *Listeria* spp. motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat fresh foods. *International Journal of Food Microbiology* 16, 99-108.

- Jay, J. M. 1996. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. *Food Control* 7, 209-214.
- Jay, J., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. *Modern Food Microbiology*. 7th edition. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, USA, pp. 598.
- Kerr, K.G., Dealer, S.F. and Lacey, R.W. 1988. Materno-fetal listeriosis from cook-chill refrigerated food. *Lancet* ii:1133.
- Kosek-Paszowska, K., Bania, J., Bystron, J., Molenda, J. and Czerw, M. 2005. *Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy* 49, 219-222.
- Lado, B.H. and Yusef, A.E. 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In Ryser E.T. & Marth E.H. (Eds), "*Listeria, listeriosis and food safety*". CRC Press. 157-214.
- Lawrence, L.M. and Gilmour, A. 1994. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (12), 4600-4604.
- Liu, D. 2008. *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press.
- Lyon, S.A., Berrang, M.E., Fedorka-Cray, P.J. Fletcher, D.L. and Meinersmann, R.J. 2008. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from a Poultry Further Processing Plant. *Foodborne Pathogens and Disease* 5(3), 253-259.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J. and Magny P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection* 53, 742-746.
- Mahmood, M.S., Ahmed, A.N. and Hussain, I. 2003. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Poultry Meat, Poultry Meat Products and Other Related Inanimates at Faisalabad. *Pakistan Journal of Nutrition* 2 (6),346-349.

- Meng, J. and Doyle, M.E. 1998. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. *Bulletin de l'Institut Pasteur* 96, 151-164.
- Miettinen, M.K., Palmu, L., Bjorkroth, K.J. and Korkeala, H. 2001. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant, retail level. *Journal of Food Protection* 64, 994-999.
- Mosteller, T.M. and Bishop, J.R. 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *Journal of Food Protection* 56, 34-41.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 14th informational supplement M100 –S14*. Vol. 24 No 1. Wayne Pa.
- Norrung, B., Andersen, J.K. and Buncic, S. 2009. Main Concerns of Pathogenic Microorganisms in Meat. In: "*Safety of Meat and Processed Meat*", F. Toldra (Ed), Springer, pp. 3-29.
- Ojeniyi, B., Wegener, H.C., Jensen, N.E. and Bisgaard, M. 1996. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. *Journal of Applied Bacteriology* 80, 395-401.
- Πανούλης, Χ., Αμπραχίμ, Α., Θεοδωρίδης, Α., Γενηγιώργης, Κ. και Καραϊωάνογλου, Π. 1990. Διερεύνηση της παρουσίας των *Listeria spp.* σε σφάγια πτηνών κατά τα διάφορα στάδια της προετοιμασίας τους καθώς και σε έτοιμα σφάγια του εμπορίου. 5^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 22-25 Νοεμβρίου 1990, Περίληψη Πρακτικών Συνεδρίου σελ. 236-237.
- Παπά Α. 1996. Συμβολή στη μελέτη της διασποράς των λιστεριών. Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα, σελ. 116, 138-139, 160.
- Papa, A., Alexiou-Daniel, St., Danielidis, B.D. and Antoniadis, A. 1996. Multiresistant strain of *Listeria monocytogenes* in Greece. *Clinical Microbiology and Infection* 2, 64-65.

- Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., and Lo Nostro, A. 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control* 21, 708-713.
- Praakle-Amin, K., Hanninen, M.L. and Korkeala, H. 2006. Prevalence and genetic characterization of *Listeria monocytogenes* in retail broiler meat in Estonia. *Journal of Food Protection* 69, 436-440.
- Rorvik, L.M. and Yndestad, M. 1991. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. *International Journal of Food Microbiology* 13, 97-104.
- Sauders, B. D., Fortes, E. D., Morse, D. L., Dumas, N., Kiehlbauch, J. A., Schukken, Y., Hibbs, J. R. and Wiedmann, M. 2003. Molecular subtyping to detect human listeriosis clusters. *Emerging Infectious Diseases* 9, 672–680.
- Skovgaard, N. and Morgen, C.A. 1988. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology* 6, 229-242.
- Soultos, N., Koidis, P., Madden, B. 2003. Presence of *Listeria* and *Salmonella* spp. in retail chicken in Northern Ireland. *Letters in Applied Microbiology* 37, 421-423.
- Swaminathan, B. 2001. *Listeria monocytogenes*. In: “*Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*”. M.P., Doyle, L.R., Beuchat, and T.J., Montville (eds). 2nd Ed. ASM Press. Washington D.C., pp. 383-409.
- Teuber, M. 1999. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 755-763.
- Troxler, R., von Graevenitz, A., Funke, G., Wiedermann, B., Stock, I. 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and Infection* 4, 405-412.

- Tsakris, A., Papa, A., Douboya, J. and Antoniadis, A. 1997. Neonatal meningitis due to multi-resistant *Listeria monocytogenes*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 39, 553-554.
- Uyttendaele, M.R., Neyts, K.D., Lips, R.M. and Debevere, J.M. 1997. Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products obtained from Belgian and French abbatoirs. Food Microbiology 14, 339-345.
- Uyttendaele, M.R., Troy de, P. and Debevere, J.M. 1999. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. Journal of Food Protection 62, 735-740.
- Vitas, A.I., Aguado, V. and Garcia-Jalon, I. 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). International Journal of Food Microbiology 90, 349-356.
- Yusel, N., Citak, S. and Onder, M. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. Food Microbiology 22, 241-245.

Κεφάλαιο 4^ο

**Απομόνωση και
ταυτοποίηση
οξυγαλακτικών
βακτηρίων από σφάγια
ορνιθίων με
ανασταλτική δράση
εναντίον των
Salmonella spp. και της
*Listeria monocytogenes***

4.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα έρευνα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ψυχρότροφα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων από σφάγια ορνιθίων κρεοπαραγωγής με ανασταλτική δράση εναντίον στελεχών των *Salmonella* spp. και της *Listeria monocytogenes*, που είχαν απομονωθεί σε προηγούμενες έρευνες μας, επίσης, από σφάγια ορνιθίων.

Για την αναζήτηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων εξετάστηκαν συνολικά 100 δείγματα ορνιθίων. Η απομόνωση τους έγινε λαμβάνοντας υπόψη τον ψυχρότροφο χαρακτήρα και την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι στελεχών των *Salmonella* spp. και της *Listeria monocytogenes*. Απομονώθηκαν αρχικά 92 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία ταυτοποιήθηκαν και εξετάστηκαν περαιτέρω για τις ψυχρότροφες ιδιότητες τους.

Από τα 92 στελέχη επιλέχθηκαν 50 τα οποία ταυτοποιήθηκαν αρχικά με τη χρήση τυποποιημένων βιοχημικών δοκιμών σε μικρογραφία (API 50 CH Micro-kits) και στη συνέχεια με μοριακή μέθοδο με αλληλούχιση της 16s-23s διαχωριστικής των γονιδίων περιοχής. Με βάση τη μοριακή μέθοδο ταυτοποιήθηκαν 5 διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων: *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paralimentarius* και *Pediococcus acidilactici*.

Επιπλέον, ελέγχθηκε η ασφάλεια της χρήσης τους από πλευράς παραγωγής των βιογενών αμινών τυραμίνης και ισταμίνης.

4.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κρέας των ορνιθίων έχει ενοχοποιηθεί ως ένα από τα συχνότερα εμπλεκόμενα τρόφιμα για την πρόκληση τροφιμογενών διαταραχών, που

οφείλονται στα βακτήρια *Salmonella* spp. και *Campylobacter* spp. Αν και το ορνίθειο κρέας αναφέρεται σπάνια ως φορέας πρόκλησης διαταραχών από *Listeria* spp. (Uyttendaele και συν., 1997), το σχετικά υψηλό ποσοστό παρουσίας της *Listeria monocytogenes* στα σφάγια των ορνιθίων αποτελεί ενδεχόμενο κίνδυνο. Η μόλυνση του ορνίθειου κρέατος μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με την εφαρμογή των Κανόνων Ορθής Βιομηχανικής και Υγιεινής Πρακτικής αλλά η πλήρης εξάλειψη τους είναι πολύ δύσκολη αν όχι αδύνατη. Μέχρι σήμερα έχουν γίνει πολλές προσπάθειες εφαρμογής μεθόδων που αποσκοπούν στη μείωση του επιπέδου μόλυνσης των σφάγιων. Μία από αυτές τις μεθόδους, για την οποία παρουσιάζεται τελευταία ιδιαίτερο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα, είναι η βιοπροστασία.

Η βιοπροστασία είναι μια πρωτοποριακή μέθοδος που εφαρμόζεται τόσο για την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των τροφίμων όσο και για την μείωση των μικροβιακών κινδύνων. Όπως αναφέρεται από τον Rodgers (2001), η βιοπροστασία συνίσταται στον ενοφθαλμισμό των τροφίμων με καλλιέργειες επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών ικανών να αναστείλουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων βακτηρίων. Οι ανταγωνιστικές αυτές καλλιέργειες οι οποίες προστίθενται στα τρόφιμα με στόχο αφ' ενός να αναστείλουν την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων και αφ' ετέρου να επιμηκύνουν τον χρόνο συντήρησης των προϊόντων, επηρεάζοντας όσο το δυνατό λιγότερο τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες, ονομάζονται προστατευτικές καλλιέργειες (Lucke, 2000). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρούνται ιδανική επιλογή για την εφαρμογή τους ως προστατευτικές καλλιέργειες γιατί αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας των περισσότερων τροφίμων, μέρος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας των ανθρώπων και των ζώων και έχουν μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης (Maragkoudakis και συν., 2009). Η ανταγωνιστική τους δράση συνίσταται στην αναστολή της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών είτε λόγω διατροφικού ανταγωνισμού, είτε λόγω της παραγωγής ενός ή περισσότερων αντιμικροβιακών μεταβολιτών όπως είναι τα οργανικά οξέα (γαλακτικό και οξικό οξύ), το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το διακετύλιο, τα αντιμικροβιακά ένζυμα, οι βακτηριοσίνες και η ρευτερίνη (Holzapfel και συν., 1995; Ray και

Bhunia, 2008). Οι βασικές προϋποθέσεις που πρέπει να χαρακτηρίζουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια για να χρησιμοποιηθούν ως προστατευτικές καλλιέργειες είναι (Lin και συν., 2007; Maragkoudakis και συν., 2009; Matamoros και συν., 2009; Vermeiren και συν., 2004):

- Να αναγνωρίζονται γενικά ως ασφαλή (Generally Recognised As Safe - GRAS)
- Να ασκούν αντιμικροβιακή δράση σε παθογόνους μικροοργανισμούς
- Να μην επηρεάζουν τις οργανοληπτικές, φυσικές και χημικές ιδιότητες των τροφίμων
- Να επιβιώνουν σε ανταγωνιστικό περιβάλλον
- Να διατηρούν τις αντιμικροβιακές ιδιότητές τους και σε θερμοκρασίες ψύξης.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια για τη συντήρηση προϊόντων ζύμωσης και θερμικής επεξεργασίας που έχουν ως βάση το κρέας και ένας μεγάλος αριθμός στελεχών έχει βρεθεί ότι ασκεί αποτελεσματική δράση έναντι παθογόνων και σαπρόφυτων μικροοργανισμών που σχετίζονται με αυτά τα τρόφιμα (Kostrzynska και Bachard, 2006; Leroy και συν., 2006; Vermeiren και συν., 2004). Αντίθετα, δεν έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες όσον αφορά τη διερεύνηση της βιοπροστασίας στο ωμό ερυθρό κρέας (Laurson και συν., 2005; Muthukumarasamy και συν., 2003; Senne και Gilliland, 2003) και ακόμα λιγότερες στο ωμό ορνίθιο κρέας (Brashears και συν., 1998; Maragkoudakis και συν., 2009).

Σύμφωνα με τον Koch (2004), υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες που περιπλέκουν τη βιοπροστασία του ωμού κρέατος όπως: α) η παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων, που αποδομούν τις βακτηριοσίνες και μειώνουν την αντιμικροβιακή δράση των βιοπροστατευτικών καλλιεργειών, β) το ωμό κρέας αλλοιώνεται από την ανάπτυξη Gram αρνητικών βακτηρίων, τα οποία γενικά δεν επηρεάζονται από τις βακτηριοσίνες που παράγονται από τα

οξυγαλακτικά βακτήρια και γ) το ωμό κρέας περιέχει ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών βακτηρίων και επομένως θα πρέπει οι προστατευτικές καλλιέργειες να μπορούν να ανταγωνιστούν με πολυάριθμα βακτηριακά είδη προκειμένου να κυριαρχήσουν στη μικροβιακή χλωρίδα του προϊόντος καθ'όλη τη διάρκεια της συντήρησής του. Ορισμένοι ερευνητές (Anang και συν., 2006; Gonzalez-Fandos και Dominguez, 2006; Zeitoun και Debevere, 1991), για να ξεπεράσουν αυτά τα προβλήματα, χρησιμοποίησαν το γαλακτικό οξύ ως μέσο ελέγχου και μείωσης της μικροβιακής ανάπτυξης στο ωμό ορνίθιο κρέας.

Ο σκοπός της έρευνας αυτής ήταν να απομονωθούν ψυχρότροφα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που προέρχονταν από τη φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος των σφαγίων των ορνιθίων τα οποία και παρουσίαζαν ανασταλτική δράση εναντίον των στελεχών των *Salmonella* spp. και της *Listeria monocytogenes*, που είχαν απομονωθεί, επίσης, από σφάγια ορνιθίων και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων σε προηγούμενα στάδια της έρευνας μας. Η βιοχημική και μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών αυτών έγινε με τη χρήση τυποποιημένων βιοχημικών διαδικασιών σε μικρογραφία (API 50 CH Micro-kits) και με αλληλούχηση της 16s-23s διαχωριστικής των γονιδίων περιοχής, αντιστοίχως. Τέλος, διερευνήθηκε η ικανότητα τους να παράγουν τις βιογενείς αμίνες τυραμίνη και ισταμίνη με σκοπό να διασφαλιστεί η δυνατότητα χρήσης τους στο ορνίθιο κρέας και στα προϊόντα του.

4.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.3.1 Δειγματοληψία

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση – απομόνωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν τεμάχια δέρματος τραχήλου που λαμβάνονταν από σφάγια ορνιθίων αμέσως μετά τη σφαγή τους και προέρχονταν από 4 διαφορετικά πτηνοσφαγεία της Β. Ελλάδας. Ένα τεμάχιο

βάρους περίπου 10 g δέρματος τραχήλου λαμβάνονταν από κάθε σφάγιο. Τα τεμάχια δέρματος από τρία σφάγια ομογενοποιούνταν πριν την εξέταση προκειμένου να σχηματίσουν το τελικό δείγμα των 25 g (ISO 17604:2003). Για την απομόνωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 100 δείγματα τα οποία πάρθηκαν από 300 σφάγια

Τα δείγματα μεταφέρονταν εντός μίας ώρας στο εργαστήριο μέσα σε ισοθερμικούς περιέκτες με πάγο και εξετάζονταν άμεσα.

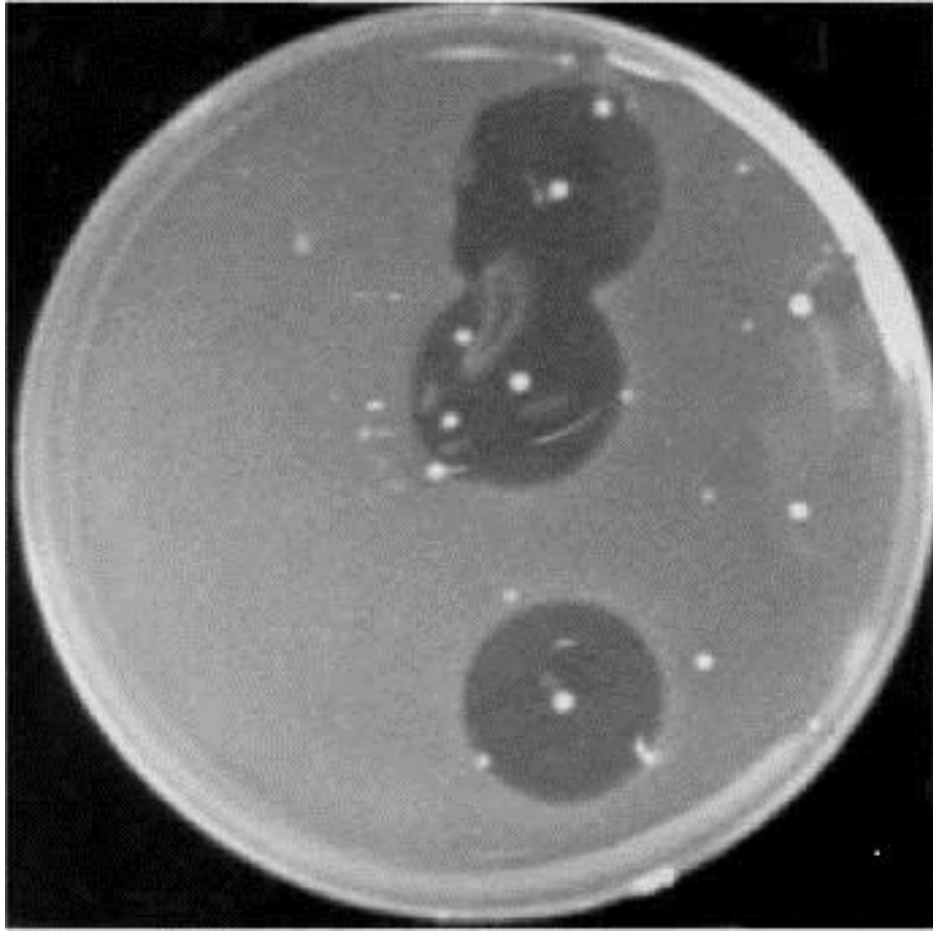
4.3.2 Απομόνωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Για την απομόνωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Αναστολής Διπλής Επίστρωσης (Double Layer Inhibition method) όπως περιγράφεται από τους Matamoros και συν. (2009), με μια μικρή τροποποίηση, που αφορά τη θερμοκρασία επώασης των στελεχών μετά την επιλογή τους. Αναλυτικά, 25 g δείγματος αναμιγνύονταν με 225 ml Buffered peptone water και ομογενοποιούνταν σε συσκευή Stomacher για 2 λεπτά. Μετά από αναζωογόνηση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ακολουθούσε η παρασκευή 4 διαδοχικών αραιώσεων στο ίδιο αραιωτικό υγρό και στη συνέχεια 0,1 ml από κάθε αραιώση ενοφθαλμιζονταν με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης σε τρυβλία petri με MRS agar. Για κάθε δείγμα, ενοφθαλμιζονταν 7 τρυβλία από κάθε αραιώση (συνολικά 35 τρυβλία petri MRS agar για κάθε δείγμα). Τα τρυβλία επωάζονταν κάτω από αναερόβιες συνθήκες στους 7°C για 10-15 μέρες και στη συνέχεια επιλέγονταν μόνο αυτά που ο αριθμός των αποικιών τους κυμαινόταν από 10 – 30.

4.3.3 Μέθοδος Αναστολής Διπλής Επίστρωσης

Τα στελέχη *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της μεθόδου είχαν απομονωθεί από σφάγια ορνιθίων και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων σε προηγούμενα στάδια της έρευνας μας. Έξι διαφορετικά στελέχη *Salmonella* spp. που ανήκουν στους οροτύπους (*S. Blockley*, *S. Paratyphi B*, *S. Bredeney*, *S.*

Neftenbach, S. Hadar και S. Thompson) επιλέχθηκαν και γινόταν μια μικτή καλλιέργεια. Μια αντίστοιχη μικτή καλλιέργεια γινόταν από δέκα διαφορετικά στελέχη *Listeria monocytogenes* και τα οποία προέρχονταν από τους δέκα διαφορετικούς υποκλάδους που βρέθηκαν με τη μέθοδο RAPD. Κάθε στέλεχος επωαζόταν στους 37°C για 48 ώρες σε ζωμό Brain Heart Infusion (BHI) και προέκυπταν αντίστοιχες καλλιέργειες με καθορισμένη συγκέντρωση. Δύο ml λαμβάνονταν από κάθε καλλιέργεια *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* για να γίνουν οι αντίστοιχες μικτές καλλιέργειες. Στη συνέχεια παρασκευάζονταν 3 δεκαδικές αραιώσεις και 1 ml από κάθε αραιώση ενοφθαλμιζόταν σε 15 ml ημίρρευστου BHI agar (37 g l⁻¹ BHI broth, 10 g l⁻¹ agar) τα οποία προσθέτονταν για να δημιουργηθεί στιβάδα επικαλύψεως στα τρυβλία MRS agar με τις 10-30 αποικίες. Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 48 ώρες και ελεγχόταν οπτικά η παρουσία ζωνών αναστολής. Βασιζόμενοι στην εμφάνιση και στη διάμετρο των ζωνών αναστολής επιλέχθηκαν 92 ύποπτες αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων και επωάστηκαν σε ζωμό MRS στους 15°C για 7 ημέρες. Στη συνέχεια επωάστηκαν και απομονώθηκαν εις διπλούν σε MRS agar στους 15°C και συντηρήθηκαν σε microbanks (PRO-LAB Diagnostics, Richmond Hill, ON, Canada) στους -80°C.



Εικόνα 4.1: Ζώνες αναστολής των οξυγαλακτικών βακτηρίων

4.3.4 Επιλογή των ψυχρότροφων οξυγαλακτικών βακτηρίων

Για να ελεγχθεί ο ψυχρότροφος χαρακτήρας των οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα στελέχη που επιλέχθηκαν ενοφθαλμιζόνταν σε MRS Broth και ακολουθούσε επώαση στους 7°C. Η ανάπτυξη τους ελεγχόταν οπτικά (θολερότητα ή ίζημα) μετά από 2 εβδομάδες από τον ενοφθαλμισμό τους. Τα στελέχη ελέγχονταν επιπλέον για 3 ακόμα ιδιότητες: χρώση κατά Gram και τις δοκιμές της καταλάσης και της οξειδάσης. Μόνο τα οξυγαλακτικά στελέχη που παρουσίαζαν θετική χρώση κατά Gram, ήταν αρνητικά στις δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης και παρουσίαζαν ψυχρότροφα χαρακτηριστικά επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση.

4.3.5 Βιοχημική ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Επιλέχθηκαν τα 50 αποτελεσματικότερα στελέχη με βάση τη συνολική ανταγωνιστική τους δράση εναντίον των στελεχών *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes* και την ικανότητα τους να αναπτύσσονται στους 7°C. Η συνολική ανταγωνιστική τους δράση αφορούσε τη διάμετρο της ζώνης αναστολής, τη συγκέντρωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των παθογόνων (η μικρότερη συγκέντρωση οξυγαλακτικών που ανέστειλε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παθογόνου) και την ικανότητα τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη τόσο των *Salmonella* spp. όσο και της *Listeria monocytogenes*. Η ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών στελεχών γινόταν αρχικά με τη χρήση των τυποποιημένων βιοχημικών διαδικασιών σε μικρογραφία (API 50 CH Micro-kits, bioMerieux SA, Marcy l'Etoile, France). Με τη μέθοδο αυτή αξιολογούνταν η ζύμωση 49 διαφορετικών υδατανθράκων. Η ζύμωση των υδατανθράκων δημιουργούσε ένα βιοχημικό προφίλ για κάθε στέλεχος το οποίο συγκρινόταν με μία βάση δεδομένων και η ταυτοποίηση γινόταν με τη χρήση ειδικού λογισμικού.

4.3.6 Μοριακή ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Για τη μοριακή ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών στελεχών εξετάσθηκε ένα στέλεχος από κάθε είδος που προέκυψε από τη βιοχημική ταυτοποίηση. Η επιλογή τους έγινε με βάση τη μεγαλύτερη βεβαιότητα ταυτοποίησης και εξετάσθηκαν συνολικά 7 στελέχη.

4.3.6.1 Εκχύλιση του γονιδιωματικού DNA

Η εκχύλιση του γονιδιωματικού DNA των επτά στελεχών γινόταν με τη χρήση ενός τροποποιημένου πρωτόκολλου που περιγράφεται από τους Psifidi και συν. (2010). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη λύση των κυττάρων μέσω ενός χαστροπικού παράγοντα που ονομάζεται υδροχλωρική γουανιδίνη (guanidinium hydrochloride - GuHCl), σε συνεργασία με σωματίδια πυριτίου. Συνοπτικά, 700 μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (8M GuHCl, 25mM EDTA, 1% Sarcosyl, 2% Triton X-100, 25mM κιτρικό νάτριο, 0.2M οξικό νάτριο, pH

ρυθμισμένο στο 5,2 με οξικό οξύ) προσθέτονταν σε διάλυμα 140 μl αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού που περιείχε κύτταρα του κάθε στελέχους και ακολουθούσε επώαση στους 70°C για 10 λεπτά. Το διάλυμα μεταφερόταν σε ένα μικροσωλήνα (2 ml) που περιείχε 300 μl χλωροφορμίου και το μίγμα αυτό ανακινούνταν έντονα σε αναδευτήρα για 5 λεπτά. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση του σε 16.000 g για 10 λεπτά και 400 μl της υδατικής φάσης που προέκυπταν μεταφέρονταν σε σωλήνα που περιείχε 200 μl αιθανόλης και το μίγμα περνούσε μέσα από μια στήλη διοξειδίου του πυριτίου (FT-2.0 Filter-Tube Spin-Column System, G. Kisker GbR, Steinfurt, Germany) με φυγοκέντρηση σε 8000 g. Το DNA που δεσμευόταν στη στήλη του διοξειδίου του πυριτίου πλενόταν διαδοχικά με φυγοκέντρηση, μια φορά με 500 μl του διαλύματος έκπλυσης "1" (4M GuHCl, 25mM Tris-HCl, pH=6,6 και 50% αιθανόλη) και δύο φορές με το διάλυμα έκπλυσης "2" (2mM Tris-HCl, pH=7, 20mM NaCl και 80% αιθανόλης), με τη χρήση 900 μl και 500 μl αντιστοίχως. Το DNA τελικά απομονώνονταν σε 100 μl προθερμασμένου (80°C) ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης (10mM Tris-HCl, pH=8) απαλλαγμένο από νουκλεάσες.

4.3.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η 16S-23S διαχωριστική των γονιδίων περιοχή (Intergenic Spacer Region, ISR) των επτά οξυγαλακτικών στελεχών πολλαπλασιαζόταν με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές (primers). Αυτοί ήταν οι 16S/p2 (5'-CTTGACACACCGCCCGTC-3') και 23S/p10 (5'-CCTTTCCCTCACGGTACTG-3'), οι οποίοι υβριδίζονταν στις θέσεις 1392 - 1410 του γονιδίου 16S rRNA και στις θέσεις 713 έως 731 του 23S rRNA γονιδίου (*Lactobacillus salivarius*, GenBank αριθμός πρόσβασης CP002034), αντιστοίχως. Το προϊόν που προέκυπτε από την PCR περιελάμβανε εκτός από την 16S-23S ISR και επιπλέον τμήματα του rDNA (περίπου 136 bp του 16S rDNA και 551 bp του 23S rDNA). Το μίγμα της PCR περιείχε 2 μl του απομονωθέντος DNA, 3μl του 10x ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), 200μm από κάθε τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο, 200nm από κάθε εκκινητή, 1,5 U της DNA

πολυμεράσης (Expand High Fidelity PCR System, Boehringer Mannheim) και νερό έως τον συνολικό όγκο της αντίδρασης (30 μ l). Το πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη του DNA με θέρμανση του διαλύματος στους 94°C για 7 λεπτά και στη συνέχεια 40 κύκλους στις εξής συνθήκες: 95°C για 30 δευτερόλεπτα, 56°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 40 δευτερόλεπτα. Το πρωτόκολλο θερμοκυκλοποίησης ολοκληρωνόταν με επώαση στους 72°C για 3 λεπτά.

4.3.6.3 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Τα προϊόντα της PCR αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη 1,5%. Η πηκτή αγαρόζη παρασκευαζόταν με τη διάλυση υψηλής καθαρότητας αγαρόζης (Invitrogen, Paisley, UK) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE (40mM Tris, 20mM Acetic Acid και 1mM EDTA, pH=8,3). Η αγαρόζη ρευστοποιόταν σε φούρνο μικροκυμάτων και τοποθετούνταν σε ειδική συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (scie-plas, UK). Για κάθε στέλεχος, 10 μ l από τα προϊόντα της PCR αναμιγνύονταν με 2 μ l διαλύματος χρωστικής ουσίας, που περιείχε 0,3% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης, 10mM Tris-HCl (pH=7,5), 10mM EDTA και 65% (w/v) σακχαρόζη, και το μίγμα τοποθετούνταν με μικροπιπέτα στα φρεάτια της πηκτής. Επιπλέον, σε κάθε πηκτή τοποθετούνταν ένας αρνητικός μάρτυρας, που περιείχε όλα τα υλικά της μεθόδου εκτός από το DNA, για τον έλεγχο πιθανών επιμολύνσεων των αντιδραστηρίων και 5 μ l DNA-δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (1 kb DNA Ladder, New England Biolabs Inc., MA, USA). Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε τάση 120 Volt για 120 λεπτά μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TAE (40mM Tris, 20mM Acetic Acid και 1mM EDTA, pH=8,3) σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε εμβάπτιση της πηκτής αγαρόζης για περίπου 30 λεπτά σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Η θέση, η ακεραιότητα και το πάχος της ζώνης του DNA γινόταν ορατά με τοποθέτηση της πηκτής πάνω από υπεριώδη ακτινοβολία σε τράπεζα φθορισμού (UVP white / UV transilluminator). Ακολουθούσε φωτογράφιση με το σύστημα Kodak digital science (Electrophoresis and analysis system 120).

4.3.6.4 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Τα είδη του γένους *Lactobacillus* περιέχουν συνήθως διαφορετικού μήκους διαχωριστικές των γονιδίων περιοχές και γι' αυτό, το προϊόν με το μικρότερο μέγεθος (περίπου 800 με 900 bp) απομονωνόταν με τη βοήθεια αποστειρωμένης λεπίδας από την πηκτή αγαρόζης και το εμπορικό σκεύασμα NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Επιλεγόταν η ζώνη DNA με το μικρότερο μήκος προϊόντος καθώς σε αυτή δεν περιέχονται γονίδια έκφρασης του t-RNA. Ο καθαρισμός γινόταν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στη συνέχεια προσδιοριζόταν η συγκέντρωση του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,2%. Γινόταν ηλεκτροφόρηση σε 2 μl από το καθαροποιημένο προϊόν PCR. Η συγκέντρωση του DNA προσδιοριζόταν με βάση το πάχος των ζωνών ύστερα από σύγκριση με δείκτη μοριακών βαρών γνωστών συγκεντρώσεων (ng) (1 kb DNA Ladder, New England Biolabs Inc., MA, USA).

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των προϊόντων της PCR προσδιοριζόταν με τη χρήση των εξωτερικών εκκινητών 16S/p2 και 23S/p10 και εσωτερικών εκκινητών 16S/p4 (5'-GCTGGATCACCTCCTTTCT-3') και 23S/p7 (5'-TGCAGGTACTIONTAGATGTTTCAGTTC-3') με τη μέθοδο διδεοξυ-αναλόγων του Sanger (ρυθμιζόμενη διακοπή της αντιγραφής του DNA).

Οι αλληλουχίες εξετάζονταν για ομοιότητες με τις καταχωρημένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων της GenBank με εφαρμογή του αλγόριθμου BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

4.3.7 Παραγωγή των βιογενών αμινών τυραμίνης και ισταμίνης

Η διερεύνηση της ικανότητας των 7 επιλεγμένων στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή τυραμίνης και ισταμίνης διενεργήθηκε με χημική ανάλυση με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Κάθε στέλεχος οξυγαλακτικού βακτηρίου ενοφθαλμιζόταν σε ζυμό MRS (Merck, Darmstadt, Germany) στο οποίο είχε προστεθεί τυροσίνη ή ιστιδίνη (Merck, Darmstadt, Germany) σε ποσοστό 2%. Μετά την επώαση τους στους 20°C για 72 ώρες, μια ποσότητα από κάθε υγρή καλλιέργεια αναμιγνυόταν με 0,6N HClO₄ (σε μια αναλογία 1: 4 αντιστοίχως). Ακολουθούσε η φυγοκέντρηση του μίγματος (12.000 rpm για 10 λεπτά) και 1 ml του υπερκείμενου υγρού περνούσε μέσα από μία σύριγγα με φίλτρο 0,20 μm (Grace, Deerfield, IL) και αποθηκευόταν στους -20°C μέχρι την ανάλυση τους. Η ανάλυση της τυραμίνης και της ισταμίνης γινόταν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με σύστημα βαθμωτής έκλουσης (HPLC system, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), όπως περιγράφεται από τους Hernandez-Jover και συν. (1996). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο σχηματισμό ζευγών ιόντων μεταξύ των βιογενών αμινών στο δείγμα και του οκτανοσουλφονικού οξέως (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA) που υπάρχει στην κινητή φάση. Ο διαχωρισμός των αμινών γινόταν μέσα από μία C 18 στήλη αντίστροφης φάσης διαστάσεων 250 x 4,6 mm και μεγέθους σωματιδίων 5 μm (Discovery, Supelco, Bellefonte, PA, USA), ακολουθούμενος από μία μετά την στήλη παραγωγοποίηση των αμινών με ο-phthaldialdehyde (OPA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) και φθορισμομετρικό προσδιορισμό τους (Shimadzu RF-10A_{XL} spectrofluorometric detector) στους 340_{ex}/445_{em}. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της τυραμίνης και της ισταμίνης βασιζόταν σε καμπύλες βαθμονόμησης (επιφάνεια κορυφής προς συγκέντρωση) σχηματοποιημένες από πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.4.1 Απομόνωση των δυνητικά βιοπροστατευτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων

Συνολικά απομονώθηκαν 92 αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων (Gram θετικά, καταλάση αρνητικά και οξειδάση αρνητικά) με τη μέθοδο αναστολής

διπλής επίστρωσης. Τα 83 στελέχη (90%) από τα 92 παρουσίαζαν ανάπτυξη μετά από 2 εβδομάδες στους 7°C (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1 Ανταγωνιστική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι των *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* και ικανότητα ανάπτυξης τους στους 7°C.

Στέλεχος οξυγαλακτικού	Αραίωση οξυγαλακτικού	Παθογόνο	Αραίωση παθογόνου	Διάμετρο ζώνης αναστολής ^α	Απομονωμένη αποικία ^β	Ανάπτυξη στους 7°C ^γ
1α	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	++
1b	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	++
1c	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	++
2a	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	++
2b	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	++
2c	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	++
3a	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	++	+	++
3b	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	++	+	++
3c	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	++	+	++
4a	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	++	-	++
4b	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	++	-	++
4c	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	++	-	++
5a	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	+++	+	+++
5b	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	+++	+	+
5c	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	+++	+	+++
6a	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	++	-	++
6b	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	++	-	++
6c	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	++	-	++
7a	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	++	+	+++
7b	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	++	+	+++
7c	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	++	+	+++
8a	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	++	-	+++
8b	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	++	-	+
8c	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	++	-	++
9a	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻³	+	+	++
9b	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻³	+	+	+++
9c	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻³	+	+	+++
11	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	+++
12	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	+++
13	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	++
14	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	++
15	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	++
16	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	++	-	++
17	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	++	+	+++
18	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	++	+	+
19	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	+++
20	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	+++
21	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	++
22	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	++	+	+++
23	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	++	+	+++
24	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	++	+	++
25	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	++	-	+++
26	10 ⁻¹	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	+++	+	+++
27	10 ⁻¹	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻¹	++	-	+++
28	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻³	+++	+	++
29	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻³	+++	+	+++
30	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻³	+++	+	+++
31	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	+++	+	+

32	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	++	+	++
33	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	+++
34	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	+++	+	+++
35	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	+++	+	+++
36	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	+++	+	+
37	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	+++	+	+++
38	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	+++	+	+++
39	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	++	+	++
40	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	+++	+	+++
41	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	+++	+	+++
42	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	+++	+	+++
43	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	++	+	+++
44	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	++	+	++
45	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	++	+	++
46	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	++	+	+++
47	10 ⁻¹	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	++	+	+++
48	10 ⁻¹	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	++	+	+++
49	10 ⁻¹	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻³	+++	+	+++
50	10 ⁻¹	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻³	+++	+	+++
51	10 ⁻¹	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	+++	+	+++
52	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻¹	+	+	+++
53	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻³	++	+	+++
54	10 ⁻¹	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	++	+	+++
55	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	+++	+	+++
56	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻¹	++	+	++
57	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	-	+
58	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	-	+++
59	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	+++
60	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	++
61	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	+++	-	++
62	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	+++	-	++
63	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	+++	+	+++
64	10 ⁻²	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻³	+++	-	+++
65	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻¹	++	+	+++
66	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻¹	++	+	+++
67	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻¹	++	-	+++
68	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	++	+	+++
69	10 ⁻²	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻¹	+++	+	+++
70	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	+
71	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	+++	+	+++
72	10 ⁻³	<i>Salmonella</i> spp.	10 ⁻²	++	-	+
73	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	+++	+	++
74	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	+++	+	+++
75	10 ⁻³	<i>L. monocytogenes</i>	10 ⁻²	++	-	+

α: +++: διάμετρος ζώνης αναστολής > 1cm, ++: 1cm > διάμετρος ζώνης αναστολής > 0,5cm, +: ζώνη αναστολής < 0,5 cm

β: + απομονωμένη αποικία, - μη απομονωμένη αποικία

γ: +++ έντονη ανάπτυξη με ίζημα, ++ καλή ανάπτυξη, + ελάχιστη ανάπτυξη

4.4.2 Βιοχημική ταυτοποίηση

Τα 50 αποτελεσματικότερα οξυγαλακτικά στελέχη επιλέχθηκαν για βιοχημική ταυτοποίηση. Η επιλογή τους βασίστηκε στην ικανότητα τους να αναπτύσσονται στους 7°C και στη συνολική τους ανταγωνιστική δράση που αφορούσε τη διάμετρο της ζώνης αναστολής, τη συγκέντρωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των παθογόνων βακτηρίων (η μικρότερη συγκέντρωση οξυγαλακτικών που ανέστειλε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παθογόνου) και την ικανότητα τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη τόσο των *Salmonella* spp. όσο και της *Listeria monocytogenes*. Με βάση το βιοχημικό προφίλ των επιλεγθέντων στελεχών προέκυψαν 7 διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το επικρατέστερο είδος ήταν το *Leuconostoc lactis* (19 στελέχη), ακολουθούμενο από το *Lactobacillus salivarius* (9 στελέχη), το *Lactobacillus fermentum* (8 στελέχη), το *Lactobacillus delbrueckii* (7 στελέχη), το *Lactobacillus acidophilus* (3 στελέχη), το *Lactobacillus brevis* (3 στελέχη) και το *Pediococcus acidilactici* (1 στέλεχος). Το ποσοστό της βεβαιότητας ταυτοποίησης μεταξύ των στελεχών του ίδιου είδους κυμαινόταν από 30,9% έως 99,9%, γεγονός που οφειλόταν σε ελαφρώς διαφορετική βιοχημική συμπεριφορά που παρουσίαζαν τα στελέχη του ίδιου είδους (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα της ταυτοποίησης οξυγαλακτικών με API 50CH.

Ταυτοποίηση είδους με βάση τα API 50 CH	Αριθμός στελεχών	Βεβαιότητα ταυτοποίησης %
<i>Leuconostoc lactis</i>	19	60,2-96,9%
<i>Lactobacillus salivarius</i>	9	98,7-99,9%
<i>Lactobacillus fermentum</i>	8	30,9-99%
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	7	55,7-97,6%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3	68,5-98,4%
<i>Lactobacillus brevis</i>	3	59,1-98,3%
<i>Pediococcus acidilactici</i>	1	99,9%

4.4.3 Μοριακή ταυτοποίηση

Από κάθε ένα από τα 7 είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που εντοπίστηκαν, επιλέχθηκε ένα στέλεχος για μοριακή ταυτοποίηση. Η επιλογή έγινε με βάση το μεγαλύτερο ποσοστό βεβαιότητας που προέκυψε από τα API 50 CH και τη καλύτερη ανασταλτική δράση. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για μοριακή ταυτοποίηση ήταν τα 5, 7, 40, 48, 51, 59 και 74.

Η σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των 7 στελεχών με τις καταχωρημένες αλληλουχίες της GenBank επέτρεψε την ταυτοποίηση όλων των στελεχών (Πίνακας 4.3). Το στέλεχος 5 προσδιορίστηκε ως *Lactobacillus johnsonii*, τα στελέχη 7 και 48 ως *Pediococcus acidilactici*, τα στελέχη 40 και 59 ως *Lactobacillus salivarius*, το στέλεχος 51 ως *Lactobacillus paralimentarius* και το στέλεχος 74 ως *Lactobacillus reuteri*.

Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα που αφορούν τη σύγκριση της βιοχημικής – μοριακής ταυτοποίησης των οξυγαλακτικών στελεχών.

Στέλεχος	Βιοχημική ταυτοποίηση		Μοριακή ταυτοποίηση		
	Είδος	Βεβαιότητα ταυτοποίησης %	Είδος	Κωδικός Καταγραφής Αλληλουχίας	Ομοιότητα %
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	96,6%	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	AE017198	99,64%
7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	97,6%	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	EF116575	99,79%
40	<i>Leuconostoc lactis</i>	96,9%	<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 5713	CP002034	99,64%
48	<i>Pediococcus acidilactici</i>	99,9%	<i>Pediococcus acidilactici</i> clone P10	AF405364	100%
51	<i>Lactobacillus brevis</i>	98,3%	<i>Lactobacillus paralimentarius</i> DSM 13238	AJ616014	99%
59	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99,9%	<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 5713	CP002034	99,86%
74	<i>Lactobacillus fermentum</i>	98%	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	CP000705	100%

4.4.4 Παραγωγή των βιογενών αμινών τυραμίνης και ισταμίνης

Στην παρούσα έρευνα κανένα από τα 7 στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν παρουσίασε ικανότητα παραγωγής των βιογενών αμινών τυραμίνης και ισταμίνης. Παράλληλα, οι συγκεκριμένες βιογενείς αμίνες δεν ανιχνεύθηκαν ούτε στα δείγματα MRS broth που περιείχαν τυροσίνη ή ιστιδίνη και δεν είχαν ενοφθαλιστεί με οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα επίπεδα τυραμίνης και ισταμίνης βρέθηκαν να είναι χαμηλότερα από τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε (Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD): 1,5 mg/l).

4.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.5.1 Απομόνωση των δυνητικά βιοπροστατευτικών βακτηρίων από τα σφάγια ορνιθίων

Η μέθοδος αναστολής διπλής επίστρωσης που περιγράφεται από τους Matamoros και συν. (2009) χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα και αποδείχθηκε ότι είναι γρήγορη και αποτελεσματική για την επιλογή βιοπροστατευτικών οξυγαλακτικών βακτηρίων με ανασταλτική δράση έναντι επιλεγμένων παθογόνων. Σε μια παρόμοια έρευνα από τους Matamoros και συν. (2009), που αφορούσε την απομόνωση ψυχρότροφων οξυγαλακτικών βακτηρίων από αλιεύματα με τη μέθοδο της αναστολής διπλής επίστρωσης, επιλέχθηκαν 132 στελέχη. Από τα 132 στελέχη, τα 54 (41%) ήταν ικανά να αναπτύσσονται στους 15°C αλλά όχι στους 30°C και από αυτά, τα 52 (96%) ταυτοποιήθηκαν ως οξυγαλακτικά βακτήρια. Η διαφορά στα ποσοστά που παρατηρήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη και στη δική μας οφείλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν για να εξεταστούν τα ψυχρότροφα χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Στη δική μας έρευνα, επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 7°C, επειδή είναι κοντά στη μέση θερμοκρασία (6,6°C) των οικιακών ψυγείων (Laquerre και συν., 2002). Σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Lima και συν. (2007), 474 βακτηριακά στελέχη, που προέρχονταν από τον πρόλοβο και το τυφλό έντερο

πουλερικών, ταυτοποιήθηκαν ως Λακτοβάκιλλοι με βάση την αρνητική τους αντίδραση στο καυστικό κάλιο, το αρνητικό αποτέλεσμα στην δοκιμή της καταλάσης και χαρακτηρίστηκαν ως Gram θετικοί βάκιλλοι. Από τα 474 στελέχη επιλέχθηκαν τα 265, τα οποία και παρουσίαζαν αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram θετικών και αρνητικών πρότυπων μικροοργανισμών (*Enterococcus*, *Listeria*, *Salmonella*) με τη spot-on-the-lawn ανταγωνιστική μέθοδο. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο τα 53 από τα 265 στελέχη *Lactobacillus* επέδειξαν αντιμικροβιακή δράση έναντι των ίδιων Gram θετικών και αρνητικών πρότυπων μικροοργανισμών με τη well-diffusion ανταγωνιστική μέθοδο κάτω από αναερόβιες συνθήκες.

4.5.2 Βιοχημική ταυτοποίηση

Από προηγούμενες μελέτες προκύπτει ότι πολλά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν απομονωθεί μέχρι τώρα από τα πουλερικά. Οι Lin και συν. (2007) βρήκαν ότι το είδος *Lactobacillus fermentum* ήταν το επικρατέστερο οξυγαλακτικό βακτήριο στο γαστρεντερικό σωλήνα των χοίρων και των πουλερικών. Οι Ibourahema και συν. (2008) απομόνωσαν *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* και *Lactobacillus paraplantarum* από τα περιττώματα και το πτέρωμα ορνιθίων σε πτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις στη Σενεγάλη. Στη Νιγηρία, οι Adesokan και συν. (2008) απομόνωσαν 3 διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων από κρέας πουλερικών, με το *Lactobacillus plantarum* να παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης 90%, ενώ το *Lactobacillus mesenteroides* και το *Lactobacillus brevis* παρουσίαζαν ποσοστό εμφάνισης 5% το καθένα. Στην Ινδονησία, οι Lengkey και συν. (2009) απομόνωσαν *Lactobacillus lactis* spp *lactis* 1 και *lactis* 2, *Lactobacillus fermentum* 1, *Lactobacillus paracasei* 1 και *Lactobacillus rhamnosus* από νωπό κρέας πουλερικών. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλοι οι παραπάνω ερευνητές χρησιμοποίησαν τα API 50 CH ως μέσο ταυτοποίησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Είναι προφανές ότι τα είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από το κρέας των πουλερικών είναι παρόμοια σε όλο τον κόσμο και υπάρχουν ορισμένες μόνο

διαφορές στα ποσοστά εμφάνισης ανάλογα με την ήπειρο ή τη χώρα όπου γίνεται η έρευνα.

4.5.3 Μοριακή ταυτοποίηση

Οι μοριακές μέθοδοι είναι περισσότερο αξιόπιστες σε σχέση με τις βιοχημικές μεθόδους και γι' αυτό προτιμώνται από πολλούς ερευνητές για την ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Ορισμένα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν στην παρούσα έρευνα όπως τα *Lactobacillus reuteri* και *Lactobacillus salivarius* έχουν επίσης απομονωθεί από τον πρόλοβο και το τυφλό έντερο πουλερικών στην Βραζιλία (Lima και συν., 2007), τα οποία και παρουσίαζαν αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Enterococcus* spp., *Listeria* spp. και *Salmonella* spp.. Σε άλλη έρευνα που έγινε στη Γαλλία, τα *L. reuteri*, *L. ingluviei*, *L. murinus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* και *Streptococcus gallolyticus* απομονώθηκαν από κόπρανα πουλερικών (Nazef και συν., 2008). Σε άλλα είδη τροφίμων, όπως είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης και το κρέας έχουν απομονωθεί *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus macedonicus*, *Lactobacillus curvatus*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* και *Pediococcus acidilactici* (Ge και συν., 2007). Επιπλέον, οι Matamoros και συν. (2009) απομόνωσαν από αλιεύματα τα *Leuconostoc gelidum*, *Lactococcus piscium*, *Lactobacillus fuchuensis* και *Carnobacterium alterfunditum*, τα οποία βρέθηκαν να έχουν ανταγωνιστικές ιδιότητες έναντι παθογόνων και σαπρόφυτων βακτηρίων.

Στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων της μοριακής και της βιοχημικής ταυτοποίησης εκτός από τις περιπτώσεις των στελεχών *Lactobacillus salivarius* και *Pediococcus acidilactici* (Πίνακας 4.2). Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα των Boyd και συν. (2005), οι οποίοι συνέστησαν ότι η παρούσα βάση δεδομένων των API 50 CH για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους

Lactobacillus μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα ή μη ερμηνεύσιμα αποτελέσματα. Οι Han και συν. (2005) ανέφεραν ότι 2 στελέχη ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση της διαχωριστικής των γονιδίων περιοχής ως *Lactobacillus gasseri* και με API 50 CH ως *L. delbrueckii* spp. *lactis* και *L. acidophilus*. Σε μια άλλη μελέτη, οι Chagnaud και συν. (2001) ανέφεραν ότι το προφίλ ζυμώσεως του *Lactobacillus salivarius* UCC43321 αντιστοιχούσε στο *L. paracasei* subsp. *Paracasei* (58,1% βεβαιότητα) και ότι το *L. reuteri* 100-23 ταυτοποιήθηκε σύμφωνα με τα API 50CH ως *L. fermentum* (96,6% βεβαιότητα). Το τελευταίο εύρημα παρατηρήθηκε επίσης και στη δική μας έρευνα όπου το στέλεχος 74 ταυτοποιήθηκε ως *L. reuteri* (100% ομοιότητα) με τη μοριακή μέθοδο και ως *L. fermentum* με τα API 50 CH (98% βεβαιότητα). Ωστόσο, στην παρούσα έρευνα και παρά τις ανακριβείς ταυτοποιήσεις, τα API 50 CH έδωσαν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τις βιοχημικές ιδιότητες των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων οι οποίες δεν θα μπορούσαν να γίνουν αντιληπτές με τη μοριακή ταυτοποίηση που εφαρμόστηκε. Αυτό ήταν εμφανές στη περίπτωση των στελεχών 40 και 59 που ανήκαν στο είδος *Lactobacillus salivarius* και είχαν ταυτόσημη νουκλεοτιδική αλληλουχία αλλά παρουσίαζαν διαφορετικό φαινοτυπικό προφίλ (Πίνακας 4.2) και επομένως εμφάνιζαν διαφορετικές προοπτικές για την εφαρμογή τους ως προστατευτικές καλλιέργειες.

4.5.4 Παραγωγή των βιογενών αμινών τυραμίνης και ισταμίνης

Η παρουσία των βιογενών αμινών αναμένεται σε τρόφιμα που περιέχουν πρωτεΐνες ή ελεύθερα αμινοξέα ως πρόδρομες μορφές, και ιδιαίτερα σε τρόφιμα που παρέχουν τις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη βιοχημικής δραστηριότητας από τους υπάρχοντες μικροοργανισμούς (Bunкова και συν., 2010). Οι βιογενείς αμίνες ανιχνεύονται συνήθως στο κρέας και στα προϊόντα με βάση το κρέας κοτόπουλου (Patsias και συν., 2006), αλλά και σε τυριά και άλλα προϊόντα ζύμωσης (Ten Brink και συν., 1990). Η τυραμίνη και η ισταμίνη θεωρούνται ως οι δύο σημαντικότερες βιογενείς αμίνες βακτηριακής προέλευσης εξαιτίας των τοξικολογικών επιδράσεων τους (Bover-Cid και Holzapfel, 1999; Shalaby, 1996). Η

παραγωγή τυραμίνης και ισταμίνης σχετίζεται με την παρουσία πολλών ειδών Gram αρνητικών μικροοργανισμών (*Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp.) στην επιφάνεια του δέρματος του κοτόπουλου (Bunkova και συν., 2010; Geornaras και συν., 1995). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν βρεθεί να έχουν την ικανότητα να παράγουν τυραμίνη και ισταμίνη σε διάφορα τρόφιμα (Kompdra και συν., 2010; Landete και συν., 2007; Moreno-Arribas και συν., 2003) αλλά και στο νωπό κοτόπουλο (Nugon-Baundon και συν., 1985). Σε μια έρευνα που διενεργήθηκε από τους Pircher και συν. (2007), ο σχηματισμός περισσότερων από 100 mg/l τυραμίνης παρατηρήθηκε στο 21,6% των στελεχών *Lactobacillus* και 14,6% των στελεχών *Leuconostoc*, ενώ η παραγωγή περισσότερων από 100 mg/l ισταμίνης ήταν ένα μάλλον σπάνιο γεγονός (3,6% των στελεχών *Lactobacillus* και *Leuconostoc*). Η παραγωγή της τυραμίνης έχει επίσης συσχετιστεί με την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactobacillus brevis*, *L. bunchneri*, *L. curvatus*, *Carnobacterium* spp. και *Enterococcus* spp. (Bover-Cid και Holzapfel, 1999). Στην ίδια έρευνα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή ισταμίνης από τα οξυγαλακτικά βακτήρια που εξετάστηκαν αν και αυτό έχει αποδειχθεί από άλλες έρευνες (Landete και συν., 2007; Straub και συν., 1995) ότι ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να παράγουν σημαντική ποσότητα ισταμίνης. Στην παρούσα έρευνα, κανένα από τα 7 επιλεγμένα στελέχη δεν παρουσίαζε την ικανότητα να παράγει τις βιογενείς αμίνες τυραμίνη και ισταμίνη. Επομένως τα στελέχη αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοπροστατευτικές καλλιέργειες στα τρόφιμα χωρίς τον κίνδυνο παραγωγής βιογενών αμινών.

Συμπερασματικά, και τα 7 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσίαζαν ικανοποιητική ανασταλτική δράση έναντι των στελεχών των *Salmonella* spp. και της *Listeria monocytogenes*, σε συνδυασμό με ψυχρότροφα χαρακτηριστικά που είναι απαραίτητα για την προοπτική τους να χρησιμοποιηθούν ως προστατευτικές καλλιέργειες. Η νουκλεοτιδική αλληλούχιση της ISR περιοχής έδειξε ότι τα στελέχη ανήκουν σε διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων όπως είναι τα *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paralimentarius* και

Pediococcus acidilactici. Η ασφάλεια της χρήσης τους επιβεβαιώθηκε όσον αφορά την παραγωγή των βιογενών αμινών τυραμίνης και ισταμίνης. Η βιοχημική τους ταυτοποίηση αποδείχθηκε ότι ήταν λιγότερο αξιόπιστη από τη μοριακή ταυτοποίηση. Η φαινοτυπική ποικιλότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε συνδυασμό με την περιορισμένη βάση δεδομένων για αυτά τα είδη περιορίζουν την ακρίβεια ταυτοποίησης των API 50 CH και των άλλων βιοχημικών μεθόδων ταυτοποίησης. Ωστόσο, η αρχική επιλογή των οξυγαλακτικών βακτηρίων που παρουσιάζουν βιοπροστατευτικές ιδιότητες θα πρέπει να στηρίζεται τόσο στη μοριακή όσο και στη βιοχημική τους ταυτοποίηση καθώς είναι πιθανό στελέχη του ίδιου είδους να παρουσιάζουν διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες. Επομένως, για την ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων με προοπτική να χρησιμοποιηθούν ως βιοπροστατευτικές καλλιέργειες, συνίσταται η χρήση τόσο φαινοτυπικών όσο και μοριακών μεθόδων.

4.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adesokan, I. A., Odetoyinbo, B. B. and Olubamiwa, A. O. 2008. Biopreservative activity of lactic acid bacteria on suya produced from poultry meat. *African Journal of Biotechnology* 7 (20), 3799-3803.
- Anang, D.M., Rusul, G., Bakar J. and Ling, F.H. 2007. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes* *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 in chicken breast stored at 4°C. *Food Control* 18, 961-969.
- Bover-Cid, S. and Holzapfel, W. H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 53, 33-41.
- Boyd, M. A., Antonio, M. A. D. and Hillier, S. L. 2005. Comparison of API 50 CH Strips to Whole-Chromosomal DNA Probes for Identification of

- Lactobacillus* Species. Journal of Clinical Microbiology 43 (10), 5309-5311.
- Brashears, M.M, Reilly, S.S. and Gilliland, S.E. 1998. Antagonistic action of cells of *Lactobacillus lactis* toward *Escherichia coli* O157:H7 on refrigerated raw chicken meat. Journal of Food Protection 61, 166-170.
- Bunkova, L., Bunka, F., Klcovska, P., Mrkvicka, V., Dolezalova, M. and Kracmar, S. 2010. Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin. Food Chemistry 121, 203-206.
- Chagnaud, P., Machinis, K., Coutte, L. A., Marecat, A. and Marcenier, A. 2001. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. Journal of Microbiological Methods 44, 139-148.
- Ge, B., Jiang, P., Han, F., Saleh, N. K., Dhiman, N., Fedorko, D. P., Nelson, N. A. and Meng, J. 2007. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Lactic Acid Bacteria from Retail Fermented Foods. Journal of Food Protection 70 (11), 2606-2612.
- Geornaras, I., Dykes, G. A. and von Holy, A. 1995. Biogenic amine formation by poultry-associated spoilage and pathogenic bacteria. Letters in Applied Microbiology 21, 164-168.
- Gonzalez-Fandos, E. and Dominguez, J.L. 2006. Efficacy of lactic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. Journal of Applied Microbiology 101, 1331–1339.
- Granly Koch, A. 2004. Biopreservation. In: Encyclopedia of Meat Sciences. Editor-in-Chief: Werner Klinth Jensen, Elsevier Ltd, pp 68-74
- Han, K.-S., Kim, Y., Choi, S., Oh, S., Park, S., Kim, S.-H. and Whang, K.-Y. 2005. Rapid Identification of *Lactobacillus acidophilus* by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and flanking 23S rRNA gene. Biotechnology Letters 27, 1183-1188.

- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T. and Vidal Carou, M.C 1996. Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44(9), 2710-2715.
- Holzappel, W. H., Geisen, R. and Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.
- Ibourahema, C., Dauphin, R. D., Jacqueline, D. and Thonart, P. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from poultry farms in Senegal. *African Journal of Biotechnology* 7 (12), 2006-2012.
- Komprda, T., Sladkova, P., Petirova, E., Dohnal, V. and Burdychova, R. 2010. Tyrosine- and histidine-decarboxylase positive lactic acid bacteria and enterococci in dry fermented sausages. *Meat Science* 86, 870-877.
- Kostrzynska, M. and Bachand, A. 2006. Use of microbial antagonism to reduce pathogen levels on produce and meat products: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 1017–1026.
- Laguerre, O., Derens, E., and Palagos, B. 2002. Study of domestic refrigerator temperature and analysis of factors affecting temperature: a French survey. *International Journal of Refrigeration* 25 (5), 653-659.
- Landete J. M., Ferrer, S. and Pardo, I. 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control* 18, 1569-1574.
- Laursen, B.G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard P. and Leisner, J.J. 2005. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 151–164.

- Lengkey, H. A. W., Balia, R. L., Togoe, I., Tasbac, B. A. and Ludong, M. 2009. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw poultry meat. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25 (5-6), 1071-1077.
- Leroy, F., Verluyten, J. and De Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106, 270-285
- Lima, E. T., Andreatti Filho, R. L., Okamoto, A. S., Noujaim, J. C., Barros, M. R. and Crocci, A. J. 2007. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 71, 103-107.
- Lin, W.-H., Yu, B., Jang, S.-H. and Tsen, H.-Y. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe* 13, 107-113.
- Lucke, F. K. 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science* 56, 105-115.
- Matamoros, S., Pilet, M. F., Gigout, F., Prevost, H. and Leroi, F. 2009. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology* 26, 638-644.
- Maragkoudakis, P. E. Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D. and Tsakalidou, E. 2009. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology* 130, 219-226.
- Moreno-Arribas M. V., Polo, M. C., Jorganes, F. and Munoz, R. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape and wine. *International Journal of Food Microbiology* 84, 117-123.

- Muthukumarasamy, P., Han, J. and Holley, R. 2003. Bactericidal effects of *Lactobacillus reuteri* and allyl isothiocyanate on *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated ground beef. *Journal of Food Protection* 66, 2038-2044.
- Nazef, L., Belguesmia, Y., Tani, A., Prévost H. and Drider, D. 2008. Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: evidence on anti-*Campylobacter* and anti-*Listeria* activities. *Poultry Science* 87, 329–334.
- Nugon-Baundon, L., Szylit, O., Chaigneau, M., Dierick, N. and Raibaud, P. 1985. Production of amines in monoxenic chicken inoculated with a *Lactobacillus* strain isolated from holoxenic (conventional) cook crop. In: *Germfree Research: Microflora Control and Its Application to the Biochemical Sciences*. B.S. Wostmann, J.R. Pleasants, and B.A. Teah, eds. Alan R. Liss,. New York, NY, pp. 119-122
- Patsias, A., Chouliara, I., Paleologos, E. K., Savvaidis, I. and Kontominas, M. G. 2006. Relation of biogenic amines to microbial and sensory changes of precooked chicken meat stored aerobically and under modified atmosphere packaging at 4°C. *European Food and Research Technology* 223, 683-689.
- Pircher, A., Bauer, F. and Paulsen, P. 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food and Research Technology* 226, 225-231.
- Psifidi, A., Dovas, C.I. and Banos, G. 2010. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. *Molecular and Cellular Probes* 24(2), 93-98
- Ray, B. and Bhunia, A. 2008. *Fundamental Food Microbiology*. 4th edition. CRC Press, Florida, USA, pp. 175-187.

- Rodgers, S. 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures-a review. *Trends in Food Science and Technology* 12, 276-284.
- Senne, M.M. and Gilliland, S.E. 2003. Antagonism action of cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* against pathogenic and spoilage microorganisms in fresh meat systems. *Journal of Food Protection* 66, 418–425.
- Shalaby A.R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* 29(7), 675-690.
- Straub, B. W., Kicherer, M., Schilcher, S. M. and Hammes, W. P. 1995. The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Z Lebensm Unters Forsch* 201, 79-82.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J. and Huis in't Veld, J.H.J. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* 11, 73-84.
- Uyttendaele, M. R., Neyts, K. D., Lips, R. M. and Debevere, J. M. 1997. Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products obtained from Belgian and French abattoirs. *Food Microbiology* 14, 339-345.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F. and Debevere, J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology* 96, 149-164.
- Zeitoun, A.A. and Debevere, J.M. 1991. Inhibition, survival and growth of *Listeria monocytogenes* on poultry as influenced by buffered lactic acid treatment and modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology* 14, 161–169.

Κεφάλαιο 5^ο

**Αξιολόγηση της
αντιμικροβιακής
δράσης των
οξυγαλακτικών
βακτηρίων εναντίον
των *Salmonella* spp. και
Listeria monocytogenes
που απομονώθηκαν
από σφάγια ορνιθίων**

5.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η έρευνα αυτή περιλαμβάνει την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης 7 στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella* spp και *Listeria monocytogenes*, που απομονώθηκαν από το δέρμα σφαγίων ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

Στην πρώτη φάση της έρευνας ελέγχθηκε η ανασταλτική δράση των οξυγαλακτικών καλλιεργειών έναντι των *Salmonella* spp και *Listeria monocytogenes* σε ζυμό BHI. Από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψαν τα εξής: α) Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρέμεινε σταθερός κατά τη διάρκεια των 5 ημερών του πειράματος στη θερμοκρασία των 7°C ανεξάρτητα από την παρουσία των παθογόνων μικροοργανισμών. β) Παρατηρήθηκε μια στατιστικώς σημαντική μείωση ($P \leq 0,05$) της αύξησης του πληθυσμού των *Salmonella* spp. και της *Listeria monocytogenes* που την 5^η μέρα κυμάνθηκε από 0,41 έως 1,12 log cfu/ml και από 0,77 έως 1,48 log cfu/ml, αντιστοίχως. γ) Από τα 7 στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων ο *Lactobacillus salivarius* παρουσίασε την καλύτερη ανασταλτική δράση τόσο έναντι των *Salmonella* spp. όσο και της *Listeria monocytogenes*

Στη δεύτερη φάση της έρευνας αξιολογήθηκε η ανασταλτική δράση του *Lactobacillus salivarius* έναντι των ίδιων παθογόνων (*Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes*) στο δέρμα και στο κρέας των ορνιθίων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε τα εξής: α) Στο δέρμα των ορνιθίων ο *Lactobacillus salivarius* προκάλεσε μείωση της αύξησης του πληθυσμού των *Salmonella* spp. και της *Listeria monocytogenes* κατά 0,54 log cfu/cm² και 0,71 log cfu/cm², αντιστοίχως, την 6^η μέρα του πειραματισμού. β) Στο κρέας των ορνιθίων η μείωση της ανάπτυξης των παθογόνων ήταν ελαφρώς μικρότερη, ενώ οι διαφορές μεταξύ των πειραματισμών στο δέρμα και στο κρέας δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ($P > 0,05$).

Τα αποτελέσματα της έρευνας μας δείχνουν ότι το είδος του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus salivarius* είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως προστατευτική καλλιέργεια, σε συνδυασμό με άλλα μικροβιακά εμπόδια, για τη βελτίωση της ασφάλειας του ορνίθιου κρέατος.

5.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κατανάλωση του ορνίθιου κρέατος και των προϊόντων του έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση αρκετών περιστατικών τροφοδηλητηριάσεων. Πιο συγκεκριμένα, το έτος 2008, το ορνίθιο κρέας ενοχοποιήθηκε σε 28 επιβεβαιωμένα κρούσματα (3,7%) στην Ευρωπαϊκή Ένωση, για τα οποία οι *Salmonella* spp. και ειδικότερα η *S. Enteritidis* ήταν ο αιτιολογικός παράγοντας (EFSA, 2010). Η απαίτηση των καταναλωτών για ασφαλή προϊόντα με παρατεταμένη διάρκεια συντήρησης έχει οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα στην αναζήτηση σύγχρονων και αποτελεσματικών μεθόδων εξυγίανσης και διασφάλισης της υγιεινής των τροφίμων. Πολλές φυσικές και χημικές μέθοδοι έχουν προταθεί ή έχουν ήδη εφαρμοστεί για την εξυγίανση των σφαγίων ορνιθίων όπως είναι ο υπέρθερμος ατμός, η ακτινοβολήση, η χρήση υπερήχων, η χρήση οργανικών οξέων, χλωριούχων και φωσφορικών ενώσεων κ.α. (Loretz και συν., 2010). Ωστόσο, υπάρχει μια τάση από πλευράς καταναλωτών στην προτίμηση πιο ήπιων και φυσικών μεθόδων για τη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων και για τον περιορισμό της ανάπτυξης των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών που ταυτόχρονα δεν επηρεάζουν τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες. Ακολουθώντας αυτή την τάση, η βιοπροστασία παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως μια εναλλακτική μέθοδος βελτίωσης της ασφάλειας και επιμήκυνσης της διάρκειας συντήρησης των τροφίμων.

Στην εφαρμογή της βιοπροστασίας, κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Τις τελευταίες δεκαετίες τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη συντήρηση προϊόντων ζύμωσης και μια

ποικιλία στελεχών έχουν βρεθεί να είναι αποτελεσματικά έναντι παθογόνων και σαπρόφυτων μικροοργανισμών που σχετίζονται με αυτά τα προϊόντα (Kostrzynska και Bachard, 2006; Leroy και συν., 2006; Vermeiren και συν., 2003). Ωστόσο, η εφαρμογή της βιοπροστασίας στο ωμό ερυθρό κρέας είναι σχετικά περιορισμένη (Laurson και συν., 2005, Muthukumarasamy και συν., 2003; Senne και Gilliland, 2003) και ακόμα λιγότερη στο ωμό ορνίθιο κρέας (Brashears και συν., 1998, Maragkoudakis και συν., 2009). Από τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα, έχουν χρησιμοποιηθεί πρότυπες καλλιέργειες στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων ή οξυγαλακτικά βακτήρια που έχουν απομονωθεί από τον εντερικό σωλήνα των πουλερικών για την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών στο ορνίθιο κρέας (Brashears και συν., 1998, Maragkoudakis και συν., 2009). Αντιθέτως, οξυγαλακτικά που έχουν απομονωθεί από την φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος των σφάγιων ορνιθίων δεν έχουν χρησιμοποιηθεί για την βιοπροστασία των προϊόντων από ορνίθιο κρέας μέχρι τώρα.

Ο σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να αξιολογηθεί η αντιμικροβιακή δράση 7 επιλεγμένων στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων που είχαν απομονωθεί από το δέρμα σφάγιων ορνιθίων με τη μέθοδο της αναστολής της διπλής επίστρωσης που περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Κατά τη διαδικασία της απομόνωσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων διαπιστώθηκε ότι 7 στελέχη προκάλεσαν αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων βακτηρίων *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes*, που είχαν επίσης απομονωθεί από ορνίθια σφάγια και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων σε προηγούμενα στάδια της παρούσας έρευνας. Το ζητούμενο, ωστόσο, ήταν να διερευνηθεί η ανταγωνιστική τους δράση έναντι των *Salmonella* spp. και της *Listeria monocytogenes* in vivo και να εκτιμηθεί η προοπτική τους για πρακτική εφαρμογή. Η αλληλεπίδραση αυτή έλαβε χώρα σε 3 διαφορετικά υποστρώματα: α) σε ζωμό BHI, β) σε δέρμα από ορνίθιο σφάγιο και γ) σε ορνίθιο κρέας.

5.3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.3.1 Προετοιμασία των καλλιιεργειών των παθογόνων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Έξι διαφορετικά στελέχη *Salmonella* spp. επιλέχθηκαν (*S. Blockley*, *S. Paratyphi B*, *S. Bredeney*, *S. Neftenbach*, *S. Hadar* και *S. Thompson*) για να σχηματίσουν μια μικτή καλλιέργεια. Μια αντίστοιχη μικτή καλλιέργεια από δέκα διαφορετικά στελέχη *Listeria monocytogenes* σχηματίστηκε, επίσης. Τα στελέχη των *Salmonella* και των *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν είχαν απομονωθεί από σφάγια ορνιθίων και από το περιβάλλον των πτηνοσφαγείων σε προηγούμενα στάδια της παρούσας μελέτης. Κάθε στέλεχος επωαζόταν στους 37°C για 48 ώρες σε θρεπτικό ζωμό Brain Heart Infusion (BHI) προκειμένου να σχηματιστούν αντίστοιχες καλλιέργειες με καθορισμένη συγκέντρωση πληθυσμού (10^6 cfu/ml). Δύο ml ελήφθησαν από κάθε καλλιέργεια *Salmonella* και *L. monocytogenes* για να σχηματιστούν οι αντίστοιχες μικτές καλλιέργειες.

Επιλέχθηκαν, επίσης, 7 στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, που είχαν απομονωθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο της μελέτης με τη μέθοδο της αναστολής της διπλής επίστρωσης, και τα οποία παρουσίαζαν ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση έναντι των παραπάνω *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes*. Τα 7 αυτά στελέχη ταυτοποιήθηκαν με βιοχημικές και μοριακές τεχνικές σε 5 είδη: *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus reuteri* και *Pediococcus acidilactici*. Σε κάθε πειραματισμό, το κάθε στέλεχος καλλιεργούνταν σε ζωμό MRS (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) στους 20°C για 72 ώρες έτσι ώστε ο πληθυσμός τους να είναι της τάξης των 10^8 cfu/ml.

Πρόσφατες καλλιέργειες *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* σε ζωμό BHI και των οξυγαλακτικών σε ζωμό MRS ετοιμάζονταν τη μέρα πριν από κάθε πειραματισμό.

5.3.2 Έλεγχος της ανταγωνιστικής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ζυμό BHI

Για την εκτίμηση της ανταγωνιστικής δράσης των οξυγαλακτικών στελεχών, 1 ml από κάθε οξυγαλακτική καλλιέργεια (10^8 cfu/ml) και 1 ml από τις μικτές καλλιέργειες των παθογόνων *Salmonella* spp. ή *Listeria monocytogenes* (10^6 cfu/ml) ενοφθαλμίζονταν σε 8 ml ζυμού BHI έτσι ώστε ο πληθυσμός τους να είναι 10^7 cfu/ml και 10^5 cfu/ml αντιστοίχως. Παράλληλα, 1 ml από κάθε οξυγαλακτική καλλιέργεια και από τις μικτές καλλιέργειες των παθογόνων *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* ενοφθαλμίζονταν σε 9 ml ζυμού BHI. Η επώαση των καλλιεργειών γινόταν στους 7°C και η καταμέτρηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των *Salmonella* spp. και των *Listeria monocytogenes* στους χρόνους (ημέρες): 0, 1, 2, 3, 4 και 5.

5.3.3 Έλεγχος της ανταγωνιστικής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο δέρμα των ορνιθίων

Τεμάχια δέρματος (περίπου 40 cm^2) λαμβάνονταν ασήπτως από το στήθος σφάγιων ορνιθίων αμέσως μετά τη σφαγή τους και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα τρυβλία πετρί. Τα δείγματα μεταφέρονταν εντός μίας ώρας στο εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής σχολής του Α.Π.Θ. μέσα σε ισοθερμικούς περιέκτες με πάγο και επεξεργάζονταν άμεσα. Κάθε τεμάχιο δέρματος κοβόταν σε 4 τεμάχια των 10 cm^2 με αποστειρωμένο νυστέρι και εξυγιαινόταν μετά από έκθεση του σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV light G30T8 254 nm, Philips Ultra Violet, Holland) σε απόσταση 40-45 cm από τη πηγή και για 15 λεπτά για κάθε πλευρά. Η πηγή UV προθερμαινόταν για μία ώρα πριν από τη χρήση της. Ποσότητα 0,1 ml καλλιέργειας *L. salivarius* (10^8 cfu/ml) και 0,1 ml από τις μικτές καλλιέργειες των *Salmonella* spp. ή των *L. monocytogenes* (10^6 cfu/ml) ενοφθαλμίζονταν στο γεωμετρικό κέντρο και ακολουθούσε η εξάπλωση τους με αποστειρωμένη γυάλινη κεκαμένη ράβδο σε όλη την επιφάνεια των τεμαχίων δέρματος έτσι ώστε ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών και των παθογόνων να είναι 10^6 cfu/ml και 10^4 cfu/ml αντιστοίχως. Παράλληλα, τεμάχια δέρματος που είχαν

ενοφθαλμιστεί μόνο με την καλλιέργεια του *L. salivarius*, των *Salmonella* spp. ή της *L. monocytogenes* προετοιμάζονταν επίσης μαζί με άλλα που δεν είχαν υποστεί καμιά μεταχείριση. Για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα των υπεριωδών ακτινών χρησιμοποιήθηκαν επίσης τεμάχια δέρματος που είχαν υποστεί μόνο ακτινοβόληση με τις υπεριώδεις ακτίνες και δεν είχαν υποστεί καμιά άλλη μεταχείριση. Όλα τα δείγματα συντηρούνταν στους 7°C και η καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών γινόταν στους χρόνους (ημέρες): 0, 1, 2, 3, 4, 5 και 6.

5.3.4 Έλεγχος της ανταγωνιστικής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο ορνίθειο κρέας

Φιλέτα ορνίθιου κρέατος λαμβάνονταν ασήπτως αμέσως μετά τη σφαγή και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένες πλαστικές σακούλες stomacher. Τα δείγματα μεταφέρονταν εντός μίας ώρας στο εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής σχολής του Α.Π.Θ. μέσα σε ισοθερμικούς περιέκτες με πάγο και επεξεργάζονταν άμεσα. Κάτω από άσηπτες συνθήκες, τα φιλέτα κόβονταν σε τεμάχια επιφάνειας 10 cm² και πάχους 5 mm με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού σε αποστειρωμένη επιφάνεια κοπής. Ποσότητα 0,1 ml από την οξυγαλακτική καλλιέργεια (*Lactobacillus salivarius*, 10⁸ cfu/ml) και 0,1 ml από τις μικτές καλλιέργειες των *Salmonella* spp. ή των *L. monocytogenes* (10⁶ cfu/ml) ενοφθαλμιζονταν στο γεωμετρικό κέντρο και ακολουθούσε η εξάπλωση τους με αποστειρωμένη γυάλινη κεκαμένη ράβδο σε όλη την επιφάνεια των τεμαχίων κρέατος έτσι ώστε ο τελικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών και των παθογόνων να είναι 10⁶ cfu/ml και 10⁴ cfu/ml, αντιστοίχως. Τεμάχια κρέατος που είχαν ενοφθαλμιστεί μόνο με την οξυγαλακτική καλλιέργεια, με *Salmonella* spp. ή με *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, μαζί με άλλα που δεν είχαν υποστεί καμιά μεταχείριση. Όλα τα δείγματα συντηρούνταν στους 7°C και η καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών γινόταν στους χρόνους (ημέρες): 0, 1, 2, 3, 4, 5 και 6.

5.3.5 Μικροβιολογικές εξετάσεις

Για όλους τους πειραματισμούς, η ομογενοποίηση των δειγμάτων γινόταν σε αποστειρωμένο διάλυμα πεπτονόχου νερού (0,1%) και οι ενοφθαλμισμοί στα στερεά υποστρώματα γίνονταν με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης. Οι αρχικές αραιώσεις για το ορνίθειο δέρμα και κρέας γίνονταν με την προσθήκη αραιωτικού σε κάθε δείγμα για την 1:10 αραιώση και ομογενοποιούνταν για 1 λεπτό σε συσκευή stomacher 400 – laboratory blender (Seward Medical, London, UK). Ακολουθούσαν κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις από τις οποίες γίνονταν ενοφθαλμισμός σε εκλεκτικά υποστρώματα με σκοπό την αρίθμηση των ενοφθαλμισμένων μικροοργανισμών. Για την αρίθμηση των *Salmonella* spp. χρησιμοποιόταν το XLD agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (37°C, 48 ώρες) και για την *Listeria monocytogenes* το Agar Listeria Ottavani and Agosti (ALOA, Biolife, Milan, Italy) (37°C, 48 ώρες). Τέλος, για την αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιόταν το MRS agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) το οποίο και επωαζόταν κάτω από αναερόβιες συνθήκες (30°C, 48 ώρες). Όλοι οι ενοφθαλμισμοί γίνονταν σε διπλή δειρά τρυβλίων και όλοι οι πειραματισμοί επαναλαμβάνονταν 3 φορές.

5.3.6 Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των μαρτύρων και των δειγμάτων που είχαν ενοφθαλμιστεί με τα οξυγαλακτικά βακτήρια διενεργήθηκε στο εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής σχολής του Α.Π.Θ. από 5 άτομα. Αξιολογήθηκε η οσμή και η εμφάνιση γλοιώδους επιστρώματος στην εξωτερική επιφάνεια του ορνίθιου δέρματος και κρέατος.

5.3.7 Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική ανάλυση και την αξιολόγηση των δεδομένων της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν τόσο παραμετρικές όσο και μη παραμετρικές μέθοδοι της συμπερασματικής στατιστικής. Η κανονικότητα των πειραματικών

δεδομένων ελέγχθηκε με τους ελέγχους των Shapiro-Wilk και του Lilliefors, ενώ η ομοιογένεια των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με τον έλεγχο του Levene. Στις περιπτώσεις που κρίθηκε αναγκαίο, έγινε κατάλληλος μετασχηματισμός των πρωτογενών δεδομένων (π.χ. σε νεπέριους λογαρίθμους, σε τετραγωνική ρίζα, κ.λ.π.), με στόχο την κανονικοποίησή τους (Zolman, 1993).

Ειδικότερα, όπου οι προϋποθέσεις κανονικότητας των δεδομένων και ομοιογένειας των διακυμάνσεων επιτεύχθηκαν, για τη στατιστική αξιολόγηση των δεδομένων που αφορούσαν στον πληθυσμό των *Salmonella* spp. ή και της *Listeria monocytogenes* στον ζωμό, σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της ανάλυσης των διακυμάνσεων μιας κατεύθυνσης, σύμφωνα με το «εντελώς τυχαίο» σχέδιο ανάλυσης (One-way Anova). Στις περιπτώσεις που η ανάλυση των διακυμάνσεων αξιολογήθηκε ως στατιστικώς σημαντική (F κατανομή), χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω ο νέος έλεγχος του πολλαπλού εύρους του Duncan, με στόχο την αξιολόγηση της ακριβούς θέσης των όποιων στατιστικών διαφορών. Σε περιπτώσεις ετερογένειας των διακυμάνσεων και μη κανονικότητας των δεδομένων, με ή χωρίς μετασχηματισμό τους, για την αξιολόγηση της επίδρασης των διαφόρων μεταχειρίσεων, αναφορικά με τον πληθυσμό των *Salmonella* spp. ή και της *Listeria monocytogenes* στον ζωμό, χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος των Kruskal-Wallis και στη συνέχεια ο μη παραμετρικός έλεγχος των Mann-Whitney (Mann-Whitney U-test).

Αναφορικά με τον πληθυσμό των *Salmonella* spp. ή και της *Listeria monocytogenes* στο δέρμα ή και στο κρέας, στην περίπτωση που επιτεύχθηκε κανονικότητα των δεδομένων, για την αξιολόγηση των πιθανών διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων εφαρμόστηκε η t κατανομή. Αντιστοίχως, σε περιπτώσεις μη κανονικότητας και ετερογένειας των διακυμάνσεων, εφαρμόστηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος του Wilcoxon (Wilcoxon ranksum nonparametric test).

Όλοι οι έλεγχοι έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($P \leq 0,05$), εκτός αν δηλώνεται διαφορετικά. Για όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS 15.0.

5.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.4.1 Ανταγωνιστική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ζυμό BHI

Οι πληθυσμοί και των 7 οξυγαλακτικών στελεχών (LAB 5: *Lactobacillus johnsonii*, LAB 7 και 48: *Pediococcus acidilactici*, LAB 40 και 59: *Lactobacillus salivarius*, LAB 51: *Lactobacillus paralimentarius* και LAB 74: *Lactobacillus reuteri*) στους ζυμούς BHI στη θερμοκρασία των 7°C παρέμειναν σταθεροί κατά τη διάρκεια των 5 ημερών του πειράματος ανεξάρτητα από την παρουσία των παθογόνων μικροοργανισμών. Η ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων ωστόσο επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση ($P \leq 0,05$) της αύξησης του πληθυσμού των *Salmonella* spp. που την 5^η μέρα κυμάνθηκε από 0,41 έως 1,12 log cfu/ml, συγκρινόμενη με τον πληθυσμό στο ζυμό BHI που ενοφθαλμίστηκε μόνο με *Salmonella* spp. (Salm. + LAB 5: 5,97 log cfu/ml, Salm. + LAB 7: 6,04 log cfu/ml, Salm. + LAB 40: 5,85 log cfu/ml, Salm. + LAB 48: 6,04 log cfu/ml, Salm. + LAB 51: 6,07 log cfu/ml, Salm. + LAB 59: 5,36 log cfu/ml, Salm. + LAB 74: 6,04 log cfu/ml, *Salmonella*: 6,48 log cfu/ml) (Πίνακας 5.1).

Η ανασταλτική δράση των οξυγαλακτικών ήταν επίσης στατιστικά σημαντική ($P \leq 0,05$) εναντίον της *Listeria monocytogenes*. Η μείωση της αύξησης του πληθυσμού της την 5^η μέρα, που προκλήθηκε από την παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων, κυμάνθηκε από 0,77 έως 1,48 log cfu/ml, συγκρινόμενη με τον πληθυσμό στο ζυμό BHI που ενοφθαλμίστηκε μόνο με *L. monocytogenes* (List. + LAB 5: 5,49 log cfu/ml, List. + LAB 7: 5,39 log cfu/ml, List. + LAB 40: 5,31 log cfu/ml, List. + LAB 48: 5,41 log cfu/ml, List. + LAB 51: 5,72 log cfu/ml, List. + LAB 59: 5,01 log cfu/ml, List. + LAB 74: 5,39 log cfu/ml, *Listeria monocytogenes*: 6,49 log cfu/ml) (Πίνακας 5.2). Από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των πειραματισμών σε ζυμό BHI προέκυψε ότι το στέλεχος *Lactobacillus salivarius* (LAB 59) ήταν το οξυγαλακτικό βακτήριο που παρουσίαζε την καλύτερη ανασταλτική δράση έναντι και των δύο παθογόνων (Γράφημα 5.1 και 5.2).

Πίνακας 5.1: Μεταβολή του πληθυσμού των *Salmonella* spp. παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο ζυμό ΒΗΙ (επώαση στους 7°C).

ΧΡΟΝΟΣ (ημέρες)	<i>Salmonella</i>		<i>Salmonella</i> + LAB 5		<i>Salmonella</i> + LAB 7		<i>Salmonella</i> + LAB 40		<i>Salmonella</i> + LAB 48		<i>Salmonella</i> + LAB 51		<i>Salmonella</i> + LAB 59		<i>Salmonella</i> + LAB 74	
	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
0	5,00	10 x10 ^{4a} ± 1,41 x10 ⁴	4,99	9,83 x10 ^{4a} ± 1,17 x10 ⁴	5,01	10,33 x10 ^{4a} ± 2,25 x10 ⁴	5,00	10 x10 ^{4a} ± 2,10 x10 ⁴	5,01	10,33 x10 ^{4a} ± 1,36 x10 ⁴	5,00	10 x10 ^{4a} ± 1,41 x10 ⁴	5,00	10 x10 ^{4a} ± 1,09 x10 ⁴	4,99	9,83 x10 ^{4a} ± 1,47 x10 ⁴
1	5,84	70,16 x10 ^{4a} ± 3,49 x10 ⁴	5,16	14 x10 ^{4e} ± 1,90 x10 ⁴	5,26	18,33 x10 ^{4d} ± 3,39 x10 ⁴	5,21	16,17 x10 ^{4d,e} ± 1,72 x10 ⁴	5,48	30,33 x10 ^{4c} ± 4,46 x10 ⁴	5,61	40,5 x10 ^{4b} ± 4,59 x10 ⁴	5,03	10,83 x10 ^{4f} ± 1,17 x10 ⁴	5,42	26,5 x10 ^{4c} ± 3,39 x10 ⁴
2	6,04	110,33 x10 ^{4a} ± 8,36 x10 ⁴	5,48	30,17 x10 ^{4f} ± 3,43 x10 ⁴	5,59	39,33 x10 ^{4e} ± 4,50 x10 ⁴	5,71	51,83 x10 ^{4d} ± 5,31 x10 ⁴	5,86	72,17 x10 ^{4c} ± 4,49 x10 ⁴	5,91	80,5 x10 ^{4b} ± 7,53 x10 ⁴	5,19	15,67 x10 ^{4g} ± 2,34 x10 ⁴	5,71	51,5 x10 ^{4d} ± 6,86 x10 ⁴
3	6,17	148,5 x10 ^{4a} ± 8,67 x10 ⁴	5,59	38,67 x10 ^{4e} ± 5,28 x10 ⁴	5,91	81,83 x10 ^{4c} ± 8,52 x10 ⁴	5,78	60,83 x10 ^{4d} ± 7,57 x10 ⁴	5,94	86,5 x10 ^{4c} ± 7,71 x10 ⁴	5,99	98 x10 ^{4b} ± 4,38 x10 ⁴	5,25	17,83 x10 ^{4f} ± 2,48 x10 ⁴	5,91	81,83 x10 ^{4c} ± 5,42 x10 ⁴
4	6,32	208 x10 ^{4a} ± 6,42 x10 ⁴	5,79	61,67 x10 ^{4c} ± 6,12 x10 ⁴	6,00	101 x10 ^{4b} ± 10,37 x10 ⁴	5,83	67,17 x10 ^{4c} ± 4,17 x10 ⁴	5,99	98,83 x10 ^{4b} ± 4,96 x10 ⁴	6,02	104,17 x10 ^{4b} ± 10,13 x10 ⁴	5,30	20 x10 ^{4d} ± 2,45 x10 ⁴	5,99	97,33 x10 ^{4b} ± 5,46 x10 ⁴
5	6,48	302,33 x10 ^{4a} ± 14,70 x10 ⁴	5,97	93,83 x10 ^{4d} ± 6,58 x10 ⁴	6,04	110,5 x10 ^{4e} ± 11,29 x10 ⁴	5,85	71,50 x10 ^{4c} ± 4,46 x10 ⁴	6,04	110,5 x10 ^{4e} ± 5,89 x10 ⁴	6,07	118,5 x10 ^{4e} ± 8,67 x10 ⁴	5,36	22,83 x10 ^{4b} ± 3,31 x10 ⁴	6,04	108,83 x10 ^{4e} ± 8,42 x10 ⁴

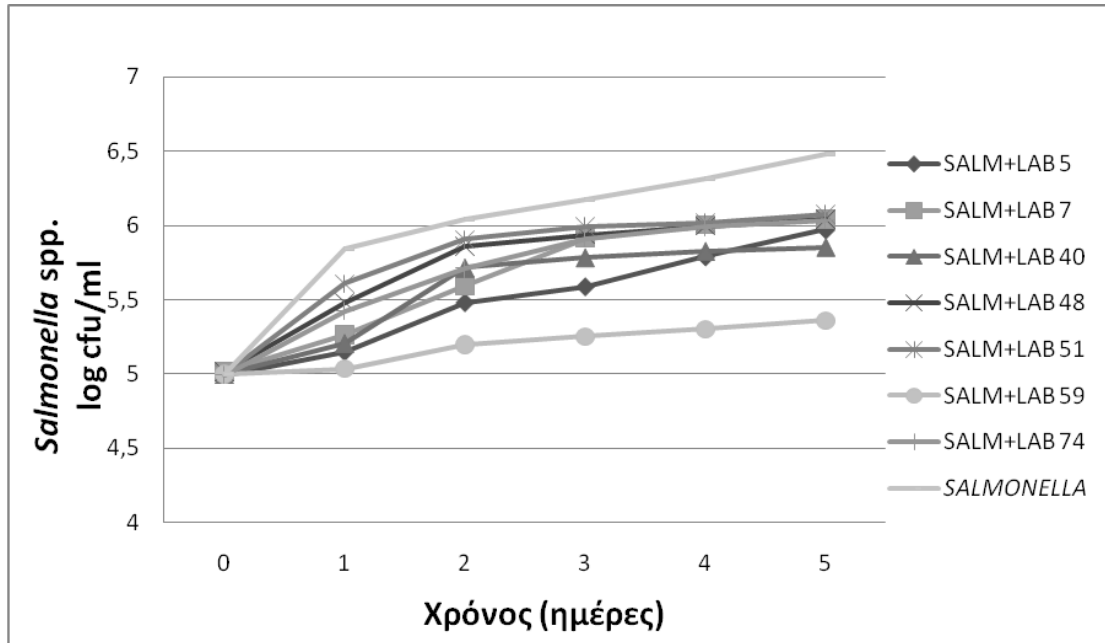
Σημείωση: a, b, c, d, e, f, g: Μέσες τιμές στην ίδια σειρά, για τον ίδιο χρόνο, με κοινό εκθέτη, δεν διαφέρουν σημαντικά (P>0,05)

Πίνακας 5.2: Μεταβολή του πληθυσμού των *L. monocytogenes* παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο ζυμό ΒΗΙ (επώαση στους 7°C).

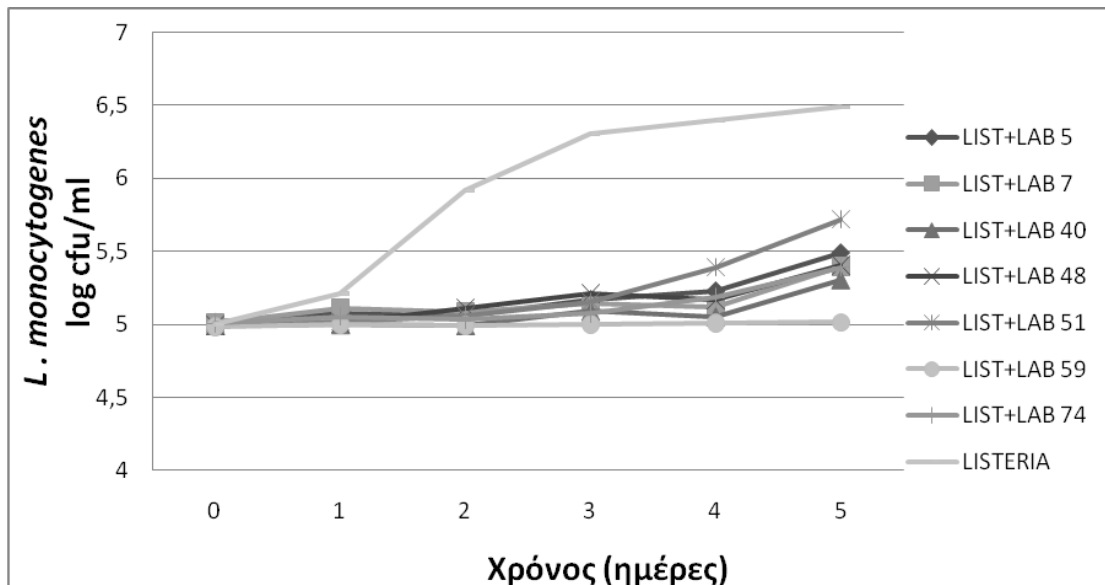
ΧΡΟΝΟΣ (ημέρες)	<i>Listeria</i>		<i>Listeria</i> + LAB 5		<i>Listeria</i> + LAB 7		<i>Listeria</i> + LAB 40		<i>Listeria</i> + LAB 48		<i>Listeria</i> + LAB 51		<i>Listeria</i> + LAB 59		<i>Listeria</i> + LAB 74	
	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
0	5,00	10 x10 ^{4a} ± 1,41 x10 ⁴	5,01	10,33 x10 ^{4a} ± 1,63 x10 ⁴	5,01	10,17 x10 ^{4a} ± 1,47 x10 ⁴	4,99	9,83 x10 ⁴ ^a ± 1,17 x10 ⁴	4,99	9,83 x10 ⁴ ^a ± 1,33 x10 ⁴	5,00	10 x10 ^{4a} ± 1,41 x10 ⁴	4,98	9,67 x10 ⁴ ^a ± 0,82 x10 ⁴	5,01	10,17 x10 ^{4a} ± 1,17 x10 ⁴
1	5,21	16,33 x10 ^{4a} ± 3,08 x10 ⁴	5,07	11,83 x10 ⁴ ^{b,c} ± 1,72 x10 ⁴	5,11	13 x10 ^{4b} ± 2,19 x10 ⁴	5,00	10 x10 ^{4c} ± 1,41 x10 ⁴	5,01	10,17 x10 ^{4c} ± 1,94 x10 ⁴	5,02	10,5 x10 ⁴ ^c ± 1,76 x10 ⁴	5,00	10 x10 ^{4c} ± 1,41 x10 ⁴	5,05	11,33 x10 ⁴ ^{b,c} ± 1,75 x10 ⁴
2	5,91	82,33 x10 ^{4a} ± 9,46 x10 ⁴	5,06	11,5 x10 ⁴ ^{b,c} ± 1,87 x10 ⁴	5,08	12,17 x10 ^{4b} ± 1,94 x10 ⁴	4,99	9,83 x10 ⁴ ^c ± 2,32 x10 ⁴	5,11	13 x10 ^{4b} ± 1,79 x10 ⁴	5,06	11,5 x10 ⁴ ^{b,c} ± 1,87 x10 ⁴	4,99	9,83 x10 ⁴ ^c ± 1,47 x10 ⁴	5,03	10,83 x10 ⁴ ^{b,c} ± 1,47 x10 ⁴
3	6,33	201 x10 ^{4a} ± 19,34 x10 ⁴	5,17	14,83 x10 ⁴ ^{b,c} ± 2,56 x10 ⁴	5,14	13,83 x10 ⁴ ^{c,d} ± 2,71 x10 ⁴	5,09	12,33 x10 ^{4d} ± 1,75 x10 ⁴	5,21	16,33 x10 ^{4b} ± 1,63 x10 ⁴	5,16	14,33 x10 ⁴ ^{b,c,d} ± 1,86 x10 ⁴	5,00	10 x10 ^{4e} ± 1,26 x10 ⁴	5,08	12 x10 ^{4d} ± 1,41 x10 ⁴
4	6,40	250,33 x10 ^{4a} ± 12,97 x10 ⁴	5,23	17 x10 ^{4c} ± 3,90 x10 ⁴	5,12	13,17 x10 ⁴ ^{d,e} ± 1,72 x10 ⁴	5,05	11,33 x10 ⁴ ^{e,f} ± 2,25 x10 ⁴	5,17	14,67 x10 ⁴ ^{c,d} ± 2,87 x10 ⁴	5,39	24,67 x10 ^{4b} ± 3,01 x10 ⁴	5,01	10,17 x10 ^{4f} ± 1,60 x10 ⁴	5,19	15,33 x10 ⁴ ^{c,d} ± 1,21 x10 ⁴
5	6,49	307 x10 ^{4a} ± 21,82 x10 ⁴	5,49	31 x10 ^{4c} ± 4,56 x10 ⁴	5,39	24,83 x10 ^{4d} ± 4,17 x10 ⁴	5,31	20,33 x10 ^{4e} ± 1,63 x10 ⁴	5,41	25,50 x10 ^{4d} ± 4,32 x10 ⁴	5,72	52,5 x10 ⁴ ^b ± 5,86 x10 ⁴	5,01	10,33 x10 ⁴ ^{b,f} ± 1,75 x10 ⁴	5,39	24,67 x10 ^{4d} ± 3,98 x10 ⁴

Σημείωση: a, b, c, d, e, f, g: Μέσες τιμές στην ίδια σειρά, για τον ίδιο χρόνο, με κοινό εκθέτη, δεν διαφέρουν σημαντικά (P>0,05)

Γράφημα 5.1: Πορεία του πληθυσμού των *Salmonella* spp. παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB 5, 7, 40, 48, 51, 59, 74) σε ζυμό BHI (επώαση στους 7°C).



Γράφημα 5.2: Πορεία του πληθυσμού των *L. monocytogenes* παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB 5, 7, 40, 48, 51, 59, 74) σε ζυμό BHI (επώαση στους 7°C).



5.4.2 Ανταγωνιστική δράση του *Lactobacillus salivarius* στο ορνίθιο

δέρμα

Με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραματισμών στο θρεπτικό ζωμό BHI, το οξυγαλακτικό στέλεχος *Lactobacillus salivarius* με την καλύτερη ανασταλτική δράση εναντίον των *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* επιλέχθηκε για περαιτέρω διερεύνηση της δράσης του έναντι των ίδιων παθογόνων βακτηρίων στην επιφάνεια του δέρματος των ορνιθίων. Ο πληθυσμός του *L. salivarius* παρέμεινε πρακτικά σταθερός κατά τη διάρκεια των 6 ημερών του πειράματος, όπως και στο ζωμό BHI. Αντιθέτως, η ανάπτυξη και των δύο παθογόνων μικροοργανισμών στο δέρμα των ορνιθίων επηρεάστηκε από την παρουσία του *L. salivarius* αφού την 6^η μέρα παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση ($P \leq 0,05$) της αύξησης του πληθυσμού τους που έφτασε $0,54 \log \text{ cfu/cm}^2$ για τη *Salmonella* spp. και $0,71 \log \text{ cfu/cm}^2$ για τη *Listeria monocytogenes*, σε σχέση με τα δείγματα που είχαν ενοφθαλμιστεί μόνο με τα παθογόνα βακτήρια (Πίνακας 5.3 και 5.4, Γράφημα 5.3 και 5.4). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος εξυγίανσης των τεμαχίων δέρματος με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) αποδείχθηκε αποτελεσματική καθώς στα τεμάχια αυτά δέρματος δεν ανιχνεύθηκαν *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* και οξυγαλακτικά βακτήρια. Αντίθετα, στα τεμάχια δέρματος που δεν είχαν υποστεί την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας, οι πληθυσμοί των *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* που καταμετρήθηκαν ήταν της τάξεως των 10^3 cfu/cm^2 , ενώ των οξυγαλακτικών βακτηρίων των 10^5 cfu/cm^2 .

Πίνακας 5.3: Μεταβολή του πληθυσμού των *Salmonella* spp. παρουσία του *Lactobacillus salivarius* στο ορνίθιο δέρμα (συντήρηση στους 7°C).

Χρόνος (ημέρες)	<i>Salmonella</i> (cfu/cm ²)		<i>Salmonella</i> + <i>L. salivarius</i> (cfu/cm ²)	
	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
0	4,03	1,07 x10 ⁴ ^a ± 0,22 x10 ⁴	4,03	1,07 x10 ⁴ ^a ± 0,17 x10 ⁴
1	4,21	1,63 x10 ⁴ ^a ± 0,25 x10 ⁴	4,14	1,37 x10 ⁴ ^a ± 0,16 x10 ⁴
2	4,52	3,30 x10 ⁴ ^a ± 0,35 x10 ⁴	4,32	2,10 x10 ⁴ ^b ± 0,26 x10 ⁴
3	4,93	8,58 x10 ⁴ ^a ± 0,52 x10 ⁴	4,59	3,92 x10 ⁴ ^b ± 0,59 x10 ⁴
4	5,27	18,48 x10 ⁴ ^a ± 1,03 x10 ⁴	4,78	6,02 x10 ⁴ ^b ± 0,49 x10 ⁴
5	5,42	26,12 x10 ⁴ ^a ± 0,94 x10 ⁴	4,90	7,87 x10 ⁴ ^b ± 0,49 x10 ⁴
6	5,53	34,17 x10 ⁴ ^a ± 1,24 x10 ⁴	4,99	9,93 x10 ⁴ ^b ± 0,69 x10 ⁴

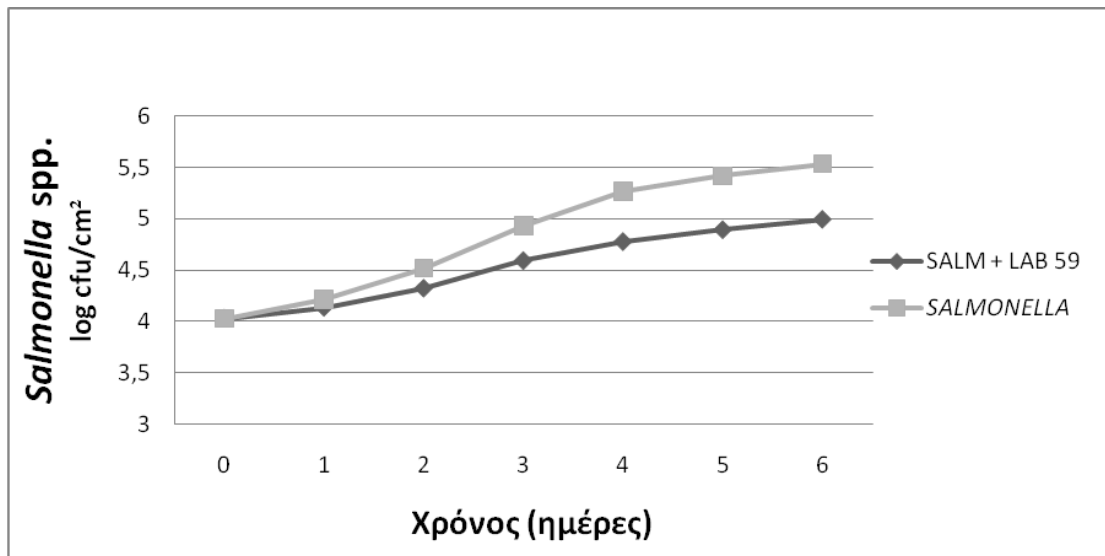
Σημείωση: a, b: Μέσες τιμές στην ίδια σειρά, για τον ίδιο χρόνο, με κοινό εκθέτη, δεν διαφέρουν σημαντικά (P>0,05) [σύγκριση μεταξύ ομάδων]

Πίνακας 5.4: Μεταβολή του πληθυσμού των *L. monocytogenes* παρουσία του *Lactobacillus salivarius* στο ορνίθιο δέρμα (συντήρηση στους 7°C).

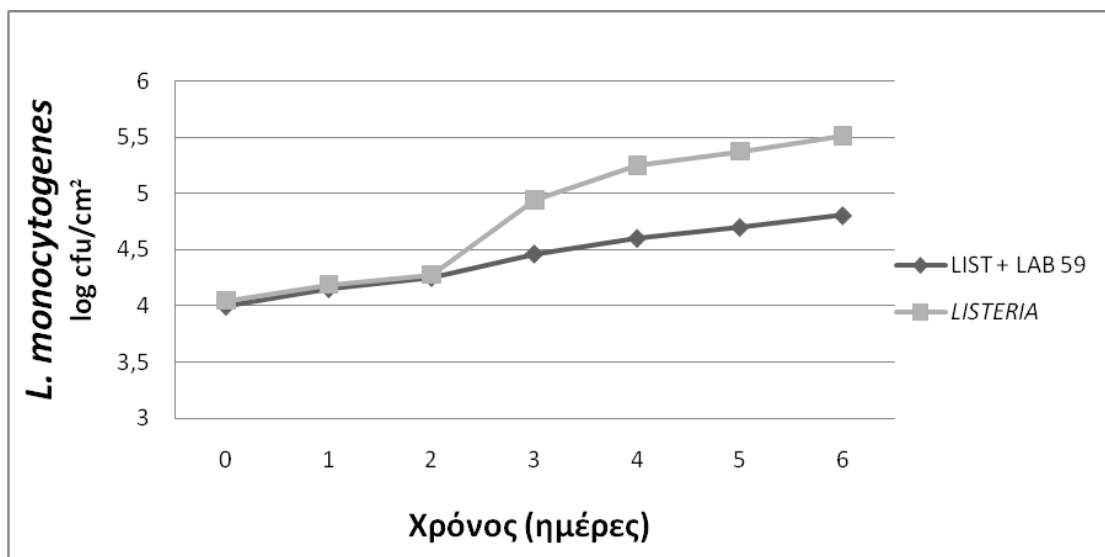
Χρόνος (ημέρες)	<i>L. monocytogenes</i> (cfu/cm ²)		<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. salivarius</i> (cfu/cm ²)	
	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
0	4,05	1,12 x10 ⁴ ^a ± 0,15 x10 ⁴	4,00	1,00 x10 ⁴ ^a ± 0,18 x10 ⁴
1	4,19	1,55 x10 ⁴ ^a ± 0,29 x10 ⁴	4,16	1,43 x10 ⁴ ^a ± 0,17 x10 ⁴
2	4,28	1,90 x10 ⁴ ^a ± 0,35 x10 ⁴	4,25	1,80 x10 ⁴ ^a ± 0,26 x10 ⁴
3	4,94	8,75 x10 ⁴ ^a ± 0,39 x10 ⁴	4,46	2,92 x10 ⁴ ^b ± 0,35 x10 ⁴
4	5,25	17,75 x10 ⁴ ^a ± 0,67 x10 ⁴	4,60	4,02 x10 ⁴ ^b ± 0,38 x10 ⁴
5	5,37	23,65 x10 ⁴ ^a ± 0,92 x10 ⁴	4,70	5,03 x10 ⁴ ^b ± 0,60 x10 ⁴
6	5,51	32,43 x10 ⁴ ^a ± 0,81 x10 ⁴	4,80	6,40 x10 ⁴ ^b ± 0,52 x10 ⁴

Σημείωση: a, b: Μέσες τιμές στην ίδια σειρά, για τον ίδιο χρόνο, με κοινό εκθέτη, δεν διαφέρουν σημαντικά (P>0,05) [σύγκριση μεταξύ ομάδων]

Γράφημα 5.3: Πορεία του πληθυσμού των *Salmonella* spp. παρουσία του *L. salivarius* (LAB 59) σε ορνίθιο δέρμα (συντήρηση στους 7°C).



Γράφημα 5.4: Πορεία του πληθυσμού των *L. monocytogenes* παρουσία του *L. salivarius* (LAB 59) σε ορνίθιο δέρμα (συντήρηση στους 7°C).



5.4.3 Ανταγωνιστική δράση του *Lactobacillus salivarius* στο ορνίθειο κρέας

Τα αποτελέσματα των πειραματισμών στο ορνίθειο κρέας ήταν παρόμοια με αυτά στο ορνίθειο δέρμα. Πιο συγκεκριμένα, την 6^η μέρα παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης ($P \leq 0,05$) ίση με $0,51 \log \text{ cfu/cm}^2$ για τις *Salmonella* spp. και $0,67 \log \text{ cfu/cm}^2$ για τη *Listeria monocytogenes* όταν ενοφθαλμίζονταν ταυτόχρονα με το *Lactobacillus salivarius*, σε σχέση με τα δείγματα που είχαν ενοφθαλμιστεί μόνο με τα παθογόνα βακτήρια (Πίνακας 5.5 και 5.6, Γράφημα 5.5 και 5.6). Η μείωση της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών στο κρέας ήταν ελαφρώς μικρότερη σε σχέση με το δέρμα, ενώ οι διαφορές μεταξύ των πειραματισμών στο ορνίθειο δέρμα και κρέας δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ($P > 0,05$). Τα παθογόνα βακτήρια *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* δεν ανιχνεύθηκαν στα τεμάχια κρέατος που δεν είχαν υποστεί καμία μεταχείριση.

Από την οργανοληπτική εξέταση των τεμαχίων κρέατος προέκυψε ότι οι υψηλοί πληθυσμοί του *Lactobacillus salivarius* στο ενοφθάλμισμα δεν είχαν αρνητική επίδραση στην οσμή και στην εμφάνιση γλοιώδους επιστρώματος.

Πίνακας 5.5: Μεταβολή του πληθυσμού των *Salmonella* spp. παρουσία του *Lactobacillus salivarius* στο ορνίθιο κρέας (συντήρηση στους 7°C).

Χρόνος (ημέρες)	<i>Salmonella</i> (cfu/cm ²)		<i>Salmonella</i> + <i>L. salivarius</i> (cfu/cm ²)	
	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
0	3,97	0,93 x10 ^{4 a} ± 0,08 x10 ⁴	4,04	1,10 x10 ^{4 a} ± 0,19 x10 ⁴
1	4,19	1,55 x10 ^{4 a} ± 0,27 x10 ⁴	4,08	1,22 x10 ^{4 b} ± 0,15 x10 ⁴
2	4,52	3,32 x10 ^{4 a} ± 0,40 x10 ⁴	4,33	2,13 x10 ^{4 b} ± 0,26 x10 ⁴
3	4,91	8,08 x10 ^{4 a} ± 0,65 x10 ⁴	4,61	4,10 x10 ^{4 b} ± 0,48 x10 ⁴
4	5,26	18,18 x10 ^{4 a} ± 1,13 x10 ⁴	4,78	6,08 x10 ^{4 b} ± 0,90 x10 ⁴
5	5,41	25,53 x10 ^{4 a} ± 1,56 x10 ⁴	4,91	8,05 x10 ^{4 b} ± 0,74 x10 ⁴
6	5,49	30,93 x10 ^{4 a} ± 0,99 x10 ⁴	4,98	9,58 x10 ^{4 b} ± 0,81 x10 ⁴

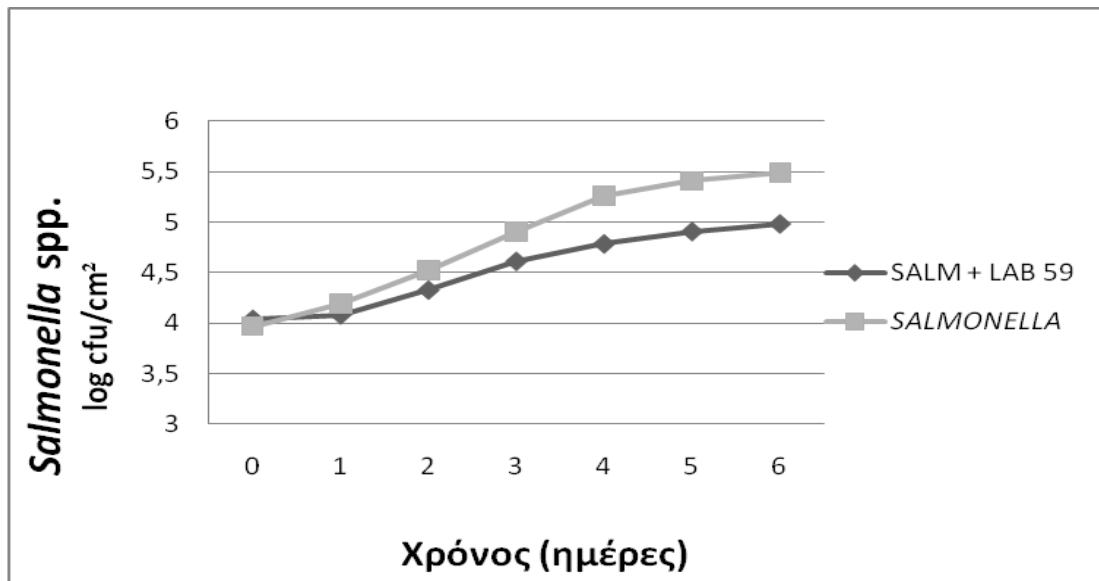
Σημείωση: a, b: Μέσες τιμές στην ίδια σειρά, για τον ίδιο χρόνο, με κοινό εκθέτη, δεν διαφέρουν σημαντικά (P>0,05) [σύγκριση μεταξύ ομάδων]

Πίνακας 5.6: Μεταβολή του πληθυσμού των *L. monocytogenes* παρουσία του *Lactobacillus salivarius* στο ορνίθειο κρέας κατά τη συντήρησή τους στους 7°C

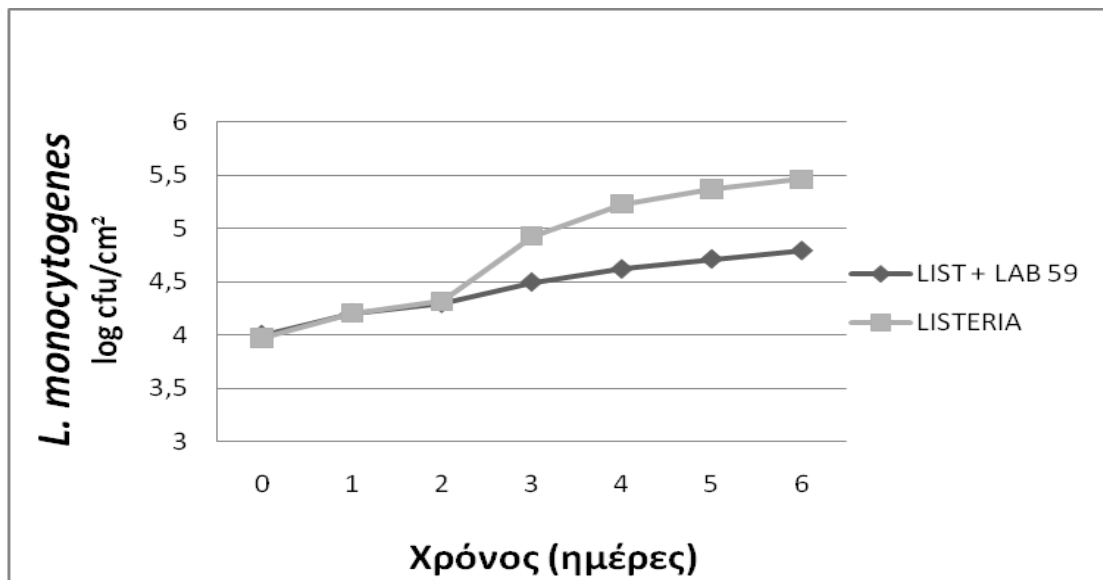
Χρόνος (ημέρες)	<i>L. monocytogenes</i> (cfu/cm ²)		<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. salivarius</i> (cfu/cm ²)	
	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση	Log ₁₀	Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση
0	3,97	0,93 x10 ^{4 a} ± 0,08 x10 ⁴	4,00	1,00 x10 ^{4 a} ± 0,20 x10 ⁴
1	4,20	1,60 x10 ^{4 a} ± 0,25 x10 ⁴	4,20	1,60 x10 ^{4 a} ± 0,24 x10 ⁴
2	4,31	2,07 x10 ^{4 a} ± 0,27 x10 ⁴	4,29	1,97 x10 ^{4 a} ± 0,20 x10 ⁴
3	4,93	8,47 x10 ^{4 a} ± 0,46 x10 ⁴	4,49	3,12 x10 ^{4 b} ± 0,33 x10 ⁴
4	5,23	16,95 x10 ^{4 a} ± 0,68 x10 ⁴	4,62	4,13 x10 ^{4 b} ± 0,50 x10 ⁴
5	5,37	23,33 x10 ^{4 a} ± 0,67 x10 ⁴	4,71	5,13 x10 ^{4 b} ± 0,33 x10 ⁴
6	5,46	28,90 x10 ^{4 a} ± 1,13 x10 ⁴	4,79	6,15 x10 ^{4 b} ± 0,54 x10 ⁴

Σημείωση: a, b: Μέσες τιμές στην ίδια σειρά, για τον ίδιο χρόνο, με κοινό εκθέτη, δεν διαφέρουν σημαντικά (P>0,05) [σύγκριση μεταξύ ομάδων]

Γράφημα 5.5: Πορεία του πληθυσμού των *Salmonella* spp. παρουσία του *L. salivarius* (LAB 59) σε ορνίθιο κρέας (συντήρηση στους 7°C).



Γράφημα 5.6: Πορεία του πληθυσμού των *L. monocytogenes* παρουσία του *L. salivarius* (LAB 59) σε ορνίθιο κρέας (συντήρηση στους 7°C).



5.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αντιμικροβιακή δράση των 7 επιλεγμένων στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων εξετάστηκε σε ζωμό BHI, και στη συνέχεια του *Lactobacillus salivarius* σε ορνίθιο δέρμα και κρέας και παρατηρήθηκαν διαφορές στην αποτελεσματικότητα τους έναντι των παθογόνων *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* ανάλογα με το υπόστρωμα ανάπτυξης. Η πιο ισχυρή ανασταλτική δράση παρατηρήθηκε στους πειραματισμούς με ζωμό BHI. Αναλυτικότερα, την 5^η μέρα του πειράματος, η παρουσία του πλέον αποτελεσματικού οξυγαλακτικού στέλεχος *Lactobacillus salivarius* προκάλεσε μια μείωση της ανάπτυξης των *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* κατά 1,12 log cfu/ml και 1,48 log cfu/ml, αντιστοίχως. Στο ορνίθιο δέρμα, η μείωση της ανάπτυξης κατά την 6η ημέρα που οφειλόταν στο ίδιο στέλεχος ήταν χαμηλότερη και βρέθηκε ίση με 0,54 log cfu/cm² για τις *Salmonella* spp. και 0,71 cfu/cm² για τη *L. monocytogenes*. Η ανασταλτική δράση του *Lactobacillus salivarius* έναντι των παθογόνων στο ορνίθιο κρέας ήταν ελάχιστα χαμηλότερη σε σχέση με το δέρμα (0,51 log cfu/cm² για τις *Salmonella* spp. και 0,67 log cfu/cm² για τη *Listeria monocytogenes*), χωρίς ωστόσο οι διαφορές μεταξύ τους να είναι στατιστικά σημαντικές (P > 0,05). Τα χαρακτηριστικά του ζωμού BHI μπορούν να ευνοήσουν την ανταγωνιστική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων και να δικαιολογήσουν την ισχυρότερη ανασταλτική τους δράση έναντι των παθογόνων σε σχέση με τη δράση τους στο ορνίθιο δέρμα και κρέας. Οι αντιμικροβιακοί μεταβολίτες, που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και είναι υπεύθυνοι για την ανασταλτική τους δράση, προφανώς διαχέονται καλύτερα στα υγρά υποστρώματα και επομένως είναι περισσότερο αποτελεσματικοί. Αντίθετα, στο ορνίθιο δέρμα και κρέας η ανασταλτική επίδραση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν λιγότερο έντονη. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα των Jones και συν. (2008) οι οποίοι αναφέρουν ότι η συμπεριφορά των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα εργαστηριακά υποστρώματα δεν είναι απαραίτητο να επαναλαμβάνεται στον ίδιο βαθμό και στα τρόφιμα. Πέραν αυτού, ο μεγαλύτερος πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο

ενοφθάλμισμα στο ζωμό BHI (10^7 cfu/ml) σε σχέση με το ορνίθιο δέρμα και κρέας (10^6 cfu/ml) μπορεί να δικαιολογήσει την ισχυρότερη ανασταλτική δράση που παρατηρήθηκε.

Η ανασταλτική δράση στελεχών *Lactobacillus salivarius* έναντι των *Salmonella* spp. έχει διαπιστωθεί και από άλλους ερευνητές (Carriga και συν., 1998; Pascual και συν., 1999; Zhang και συν., 2007a; Zhang και συν., 2007b). Στις μελέτες αυτές ο *Lactobacillus salivarius* είχε απομονωθεί από τον πρόλοβο ή/και το τυφλό έντερο ορνιθίων και είχε χορηγηθεί μαζί με την τροφή. Η αντιμικροβιακή του δράση είχε αποδοθεί στην παραγωγή γαλακτικού οξέος σε συνδυασμό με άλλα οργανικά οξέα (Carriga και συν., 1998). Άλλοι ερευνητές (Audisio και Apella, 2006) ανέφεραν ότι ο *Lactobacillus salivarius*, που είχε απομονωθεί από τον πρόλοβο ορνιθίων, είχε βακτηριοστατική δράση έναντι των *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes*. Ο αντιμικροβιακός μεταβολίτης που παραγόταν από το *Lactobacillus salivarius* και ήταν υπεύθυνος για τη βακτηριοστατική του δράση δεν ήταν κάποιο οργανικό οξύ ή το υπεροξειδίο του υδρογόνου αλλά θεωρήθηκε ότι ήταν μια βακτηριοσίνη ή κάποια ουσία με ανάλογη δράση.

Σε μια ανάλογη έρευνα των Maragkoudakis και συν. (2009), χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα στελέχη οξυγαλακτικών, ως προστατευτικές καλλιέργειες, σε προϊόντα από ορνίθιο κρέας. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η μείωση της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών στο ορνίθιο κρέας ήταν μεγαλύτερη από ότι στην παρούσα μελέτη, καθώς την 7^η μέρα η μείωση ήταν ίση με 1,2 log cfu/g για τις *Salmonella* spp. και 0,7 log cfu/g για τη *Listeria monocytogenes*. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι η επιλογή των αποτελεσματικότερων οξυγαλακτικών στελεχών είχε γίνει μεταξύ 635 πρότυπων οξυγαλακτικών καλλιεργειών που είχαν απομονωθεί από διάφορα τρόφιμα και ότι διαφορετικά στελέχη οξυγαλακτικών βρέθηκαν αποτελεσματικότερα για τις *Salmonella* spp. (*Lactobacillus fermentum*) και *L. monocytogenes* (*Enterococcus faecium*). Παράλληλα, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στο ενοφθάλμισμα ήταν υψηλότερος (10^7 cfu/g) και οι πειραματισμοί γίνονταν σε κιμά από ορνίθιο κρέας. Συγκρινόμενα τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας με αυτά των

Maragkoudakis και συν. (2009) κρίνονται ως ιδιαίτερα ικανοποιητικά, λαμβάνοντας υπόψη ότι χρησιμοποιήθηκε μικρότερος αριθμός οξυγαλακτικών βακτηρίων (92) για την επιλογή του πλέον αποτελεσματικού στελέχους (Sakaridis και συν., 2011). Επιπλέον, το στέλεχος αυτό παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι και των δύο παθογόνων βακτηρίων και απομονώθηκε από το δέρμα των σφάγιων ορνιθίων και επομένως δεν τίθεται θέμα προσαρμογής του και ο ενοφθαλμισμός του στο σφάγιο δεν επηρεάζει ποιοτικά τη φυσιολογική του μικροβιακή χλωρίδα.

Στην παρούσα έρευνα, όπως και στην έρευνα των Maragkoudakis και συν. (2009), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια και των τριών πειραμάτων. Η συντήρηση των δειγμάτων στους 7°C για 5 ή 6 μέρες δεν επηρέασε τον πληθυσμό τους και αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο πολλαπλασιασμός τους δεν ήταν απαραίτητος για την εκδήλωση της αντιμικροβιακής τους δράσης. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα των Amezcuita και Brashears (2002) και Ruby και Ingham (2009) οι οποίοι ανέφεραν ότι η ανασταλτική δράση των λακτοβακίλλων μπορεί να προκύψει ακόμα και χωρίς τον πολλαπλασιασμό τους, εξαιτίας της συνεχούς παραγωγής αντιμικροβιακών μεταβολιτών κατά τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων.

Από τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου του ορνίθιου κρέατος καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης του παρατηρήθηκε ότι ο ενοφθαλμισμός του με την οξυγαλακτική καλλιέργεια δεν είχε αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρέμεινε πρακτικά σταθερός κατά τη διάρκεια της συντήρησης των 6 ημερών. Επιπροσθέτως, η επιφάνεια του κρέατος που είχε ενοφθαλμιστεί με το *Lactobacillus salivarius* δεν παρουσίαζε γλοιώδες επίστρωμα και είχε μια ευχάριστη οσμή. Αντίθετα, στην επιφάνεια του κρέατος που δεν είχε υποστεί καμιά μεταχείριση είχε αρχίσει να αναπτύσσεται στις τελευταίες 2 μέρες της συντήρησης μια ελαφριά γλοιώδης επίστρωση. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Brashears και συν. (1998), σύμφωνα με τους

οποίους ο ενοφθαλμισμός ορνίθιου κρέατος με *Lactobacillus lactis* προκάλεσε την αναστολή της ανάπτυξης των ψυχρότροφων σαπρόφυτων μικροοργανισμών. Το ορνίθιο κρέας συνήθως αλλοιώνεται λόγω της ανάπτυξης αυτών των ψυχρότροφων σαπρόφυτων μικροοργανισμών (Barnes, 1976). Επομένως, ο ενοφθαλμισμός του ορνίθιου κρέατος με *Lactobacillus salivarius* μπορεί να αποτελέσει μια εναλλακτική πρόταση για την αναστολή της ανάπτυξης αυτών των μικροοργανισμών και την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης των ορνίθιων σφάγιων και των προϊόντων τους.

Συνοψίζοντας, ο ενοφθαλμισμός στελεχών *Lactobacillus salivarius* βρέθηκε να έχει σημαντική ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των παθογόνων *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* σε ζωμό BHI, στο ορνίθιο δέρμα και στο κρέας. Μπορεί μεν να μην προκαλούσε την πλήρη ανασχεση της ανάπτυξής τους ή την θανάτωση τους, σε συνδυασμό όμως με άλλα μικροβιακά εμπόδια και την εφαρμογή των Κανόνων Ορθής Υγιεινής και Βιομηχανικής Πρακτικής μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ασφάλεια των προϊόντων από ορνίθιο κρέας. Επιπλέον, ο οργανοληπτικός έλεγχος οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη του *Lactobacillus salivarius* όχι μόνο μείωσε την ανάπτυξη των παθογόνων αλλά ανέστειλε ταυτόχρονα και την ανάπτυξη γλοιώδους επιστρώματος στο κρέας και βελτίωσε τη συνολική του εικόνα. Η προσθήκη αντιμικροβιακών μεταβολιτών στη δεξαμενή ψύξης των σφαγίων των ορνιθίων, με σκοπό την αναστολή ανάπτυξης των παθογόνων, έχει αξιολογηθεί σε διάφορες μελέτες (Brashears και συν., 1998). Μία εναλλακτική πρόταση θα μπορούσε να ήταν η προσθήκη κυττάρων *Lactobacillus salivarius* στη δεξαμενή ψύξης σε λυοφιλοποιημένη μορφή, σε συνδυασμό με άλλα μικροβιακά εμπόδια, με σκοπό να βελτιωθεί η ασφάλεια και να επιμηκυνθεί ο χρόνος συντήρησης των προϊόντων από ορνίθιο κρέας.

5.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amezquita, A. and Brashears M. M. 2002. Competitive Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection* 65(2), 316-325.
- Audisio, M. C. and Apella, M. C. 2006. Bacteriocin-like Substance Produced by *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* CRL1384 with Anti-*Listeria* and Anti-*Salmonella* Effects. *Research Journal of Microbiology* 1(1), 61-69.
- Barnes, E. M. 1976. Microbiological problems of poultry at refrigeration temperatures. A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 27, 777-782.
- Brashears, M.M, Reilly, S.S. and Gilliland, S.E. 1998. Antagonistic action of cells of *Lactobacillus lactis* toward *Escherichia coli* O157:H7 on refrigerated raw chicken meat. *Journal of Food Protection* 61, 166-170.
- Brashears, M.M., Amezquita, A. and Jaroni, D. 2005. Lactic acid bacteria and their use in animal feeding to improve food safety. *Advances in Food and Nutrition Research* 50, 1-31.
- EFSA Anonymous. 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in European Union in 2008. *EFSA Journal* 8:1496, 3-313.
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J. M. and Hugas, M. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *Journal of Applied Microbiology* 84, 125-132.
- Helander, I.M., von Wright, A., and Matilla-Sandholm, T-M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology* 8, 146-150.

- Holzapfel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.
- Jay, J.M. 1996. Microorganisms in fresh ground meats: The relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Science* 43, 59-66.
- Jones, R.J., Hussein, H.M., Zagorec, M., Brightwell, G. and Tagg, J.R. 2008. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology* 25, 228-234.
- Kostrzynska, M. and Bachand, A. 2006. Use of microbial antagonism to reduce pathogen levels on produce and meat products: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 1017–1026
- Laursen, B.G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P. and Leisner, J.J. 2005. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 151–164.
- Leroy, F., Verluyten, J. and De Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106, 270-285
- Loretz, M., Stephan, R. and Zweifel, C. 2010. Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: A literature survey. *Food Control* 21, 791-804.
- Lucke, F.K., 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science* 56, 105-115.
- Maragkoudakis, P. E., Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D. & Tsakalidou, E. 2009. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat

- against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. International Journal of Food Microbiology 130, 219-226.
- Muthukumarasamy, P., Han, J. and Holley, R. 2003. Bactericidal effects of *Lactobacillus reuteri* and allyl isothiocyanate on *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated ground beef. Journal of Food Protection 66, 2038– 2044.
- Pascual, M., Hugas, M., Badiola, J. I., Monfort, J. M. and Garriga, M. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 Prevents *Salmonella enteritidis* Colonization in Chickens. Applied and Environmental Microbiology 65 (11), 4981-4986.
- Ruby, J. R. and Ingham, S. C. 2009. Evaluation of Potential for Inhibition of Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and Multidrug-Resistant *Salmonella* Serovars in Raw Beef by Addition of a Presumptive *Lactobacillus sakei* Ground Beef Isolate. Journal of Food Protection 72(2), 251-259.
- Senne, M. M. and Gilliland, S. E. 2003. Antagonism action of cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* against pathogenic and spoilage microorganisms in fresh meat systems. Journal of Food Protection 66, 418–425.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F. & Debevere, J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. International Journal of Food Microbiology 96, 149-164.
- Zhang, G., Ma, L., and Doyle, M., P. 2007a. Potential Competitive Exclusion Bacteria from Poultry Inhibitory to *Campylobacter jejuni* and *Salmonella*. Journal of Food Protection 70 (4), 867-873.
- Zhang, G., Ma, L., and Doyle, M., P. 2007b. Salmonellae Reduction in Poultry by Competitive Exclusion Bacteria *Lactobacillus salivarius* and *Streptococcus cristatus*. Journal of Food Protection 70 (4), 874-878.

Zolman, J. 1993. Biostatistics. Experimental Design and Statistical Inference.
Oxford University Press, Inc., New York.

Κεφάλαιο 6^ο

Γενικά συμπεράσματα

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Η συχνότητα απομόνωσης *Salmonella* spp. από τα σφάγια ορνιθίων ήταν υψηλή ενώ από τις επιφάνειες των πτηνοσφαγείων χαμηλή.
- Επικρατών ορότυπος ήταν ο *S. Blockley*. Αν και οι ορότυποι *S. Enteritidis* και *S. Typhimurium* αποτελούν συνήθως τις πιο συχνές αιτίες πρόκλησης ανθρώπινης Σαλμονέλωσης, από την έρευνα μας προκύπτει ότι η κατανομή των οροτύπων των *Salmonella* spp. μπορεί να διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τη χρονική περίοδο της μελέτης και ότι ο ορότυπος *S. Blockley* θα πρέπει να θεωρείται πλέον ως ένας από τους επικρατέστερους ορότυπους *Salmonella* spp. που απομονώνονται από σφάγια ορνιθίων.
- Ένα ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό πολυανθεκτικότητας παρατηρήθηκε στην έρευνα μας μεταξύ των στελεχών *Salmonella* spp., με φαινότυπους ανθεκτικότητας που αντανakλούν την εκτεταμένη χρήση των αντιβιοτικών.
- Η συχνότητα απομόνωσης των *Listeria* spp. και *Listeria monocytogenes* από τα σφάγια ορνιθίων και από τις επιφάνειες των πτηνοσφαγείων ήταν υψηλή.
- Σύμφωνα με την ανάλυση που προέκυψε με τη μέθοδο RAPD, τα 55 στελέχη *L. monocytogenes* κατηγοριοποιήθηκαν σε 2 κλάδους (A-B) και κάθε κλάδος χωρίστηκε σε υποκλάδους (A1-A4, B1a, B1b, B2a, B2b, B3, B4).
- Όσον αφορά την ευαισθησία της *Listeria monocytogenes* στα αντιβιοτικά, όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν βρέθηκαν ευαίσθητα στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία της λιστερίωσης.
- Η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στην κλινδαμυκίνη και τετρακυκλίνη δεν μπορεί να αποκλείσει ωστόσο την πιθανότητα να εμφανιστεί

μελλοντικά και σε άλλα αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα να ανατραπεί η σημερινή κατάσταση της αποτελεσματικής θεραπείας της λιστερίωσης.

- Η νουκλεοτιδική αλληλούχιση της ISR περιοχής των επτά στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων κρεοπαραγωγής και παρουσίαζαν ικανοποιητική ανασταλτική δράση έναντι των *Salmonella* spp. και της *Listeria monocytogenes*, έδειξε ότι ανήκουν σε 5 διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων: *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paralimentarius* και *Pediococcus acidilactici*.
- Η ασφάλεια της χρήσης τους επιβεβαιώθηκε όσον αφορά την μη παραγωγή των βιογενών αμινών τυραμίνης και ισταμίνης.
- Η βιοχημική τους ταυτοποίηση αποδείχθηκε ότι ήταν λιγότερο αξιόπιστη από τη μοριακή ταυτοποίηση. Η φαινοτυπική ποικιλότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε συνδυασμό με την περιορισμένη βάση δεδομένων για αυτά τα είδη περιορίζουν την ακρίβεια ταυτοποίησης των API 50 CH και των άλλων βιοχημικών μεθόδων ταυτοποίησης.
- Η αρχική επιλογή των οξυγαλακτικών βακτηρίων που παρουσιάζουν βιοπροστατευτικές ιδιότητες θα πρέπει να στηρίζεται τόσο στη μοριακή όσο και στη βιοχημική τους ταυτοποίηση καθώς είναι πιθανό στελέχη του ίδιου είδους να παρουσιάζουν διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες.
- Και τα 7 οξυγαλακτικά στελέχη παρουσίαζαν ικανοποιητική ανασταλτική δράση έναντι των *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes* σε ζυμό BHI.
- Στο ορνίθειο δέρμα, η μείωση της ανάπτυξης που οφειλόταν στο *Lactobacillus salivarius* ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τους πειραματισμούς στο ζυμό BHI. Στο ορνίθειο κρέας, η μείωση της ανάπτυξης ήταν ελάχιστα χαμηλότερη σε σχέση με το δέρμα, χωρίς ωστόσο οι διαφορές μεταξύ τους να είναι στατιστικά σημαντικές.
- Ο ενοφθαλμισμός στελεχών *Lactobacillus salivarius* στο ορνίθειο δέρμα και στο κρέας μπορεί να μην προκαλούσε την πλήρη ανάσχεση της

ανάπτυξης των *Salmonella* spp. και *L. monocytogenes*, σε συνδυασμό όμως με άλλα μικροβιακά εμπόδια και την εφαρμογή των Κανόνων Ορθής Υγιεινής και Βιομηχανικής Πρακτικής μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ασφάλεια των προϊόντων από ορνίθιο κρέας.

- Ο οργανοληπτικός έλεγχος οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη του *Lactobacillus salivarius* ανέστειλε ταυτόχρονα και την ανάπτυξη γλοιώδους επιστρώματος στο κρέας και βελτίωσε τη συνολική του εικόνα.

Κεφάλαιο 7^ο

Προτεινόμενη συμπληρωματική έρευνα

Συμπληρωματική έρευνα προς τη παρούσα μελέτη θα μπορούσε να διενεργηθεί με σκοπό να επαληθεύσει και να επεκτείνει τα ευρήματα της παρούσης, αλλά και να εξετάσει επιπλέον παραμέτρους που δεν κατέστη δυνατό να ερευνηθούν. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η συνδυαστική δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο ορνίθειο δέρμα και κρέας σε συνθήκες κενού ή σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες. Ο παραπάνω πειραματισμός θα μπορούσε να συνδυαστεί με την εμφάνιση των δειγμάτων ορνιθίου κρέατος σε αραιό διάλυμα σακχάρου πριν τον ενοφθαλμισμό τους με τα οξυγαλακτικά βακτήρια, με σκοπό την διευκόλυνση της ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων και τη μεγιστοποίηση της παραγωγής των αντιμικροβιακών τους μεταβολιτών. Εναλλακτική έρευνα θα μπορούσε να είναι η διερεύνηση του μηχανισμού που προκαλεί την αντιμικροβιακή δράση των συγκεκριμένων οξυγαλακτικών στελεχών και η απομόνωση των αντιμικροβιακών μεταβολιτών των οξυγαλακτικών βακτηρίων που δυσχεραίνουν τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων βακτηρίων. Οι αντιμικροβιακοί αυτοί μεταβολίτες θα μπορούσαν να εφαρμοστούν απευθείας στο ορνίθειο κρέας σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων που τους παράγουν.

Κεφάλαιο 8^ο

Δημοσιεύσεις

Μέρη της διδακτορικής διατριβής έχουν δημοσιευθεί σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά ως εξής:

1. Sakaridis, I., Soutos, N., Iossifidou, E., Koidis, P. and Ambrosiadis, I. 2011a. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars from chicken carcasses in Northern Greece. *Journal of Food Safety* 31(2), 203-210. Impact factor: 0,646
2. Sakaridis, I., Soutos, N., Iossifidou, E., Papa, A., Ambrosiadis, I. and Koidis, P. 2011b. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken carcasses. *Journal of Food Protection* 74(6), 1017-1021. Impact factor: 1,960
3. Sakaridis, I., Soutos, N., Dovas, C. I., Papavergou, E., Ambrosiadis, I. and Koidis, P. 2011c. Isolation and identification of lactic acid bacteria from chicken carcasses with inhibitory activity against *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Anaerobe*. In press. Impact factor: 2,448

Μέρη της διδακτορικής διατριβής έχουν ανακοινωθεί σε διεθνή και ελληνικά συνέδρια ως εξής:

1. Sakaridis, I., Soutos, N. and Koidis, P. Prevalence of *Salmonella* serovars in poultry carcasses in Northern Greece. Final COST 920 meeting, "Foodborne zoonosis: a co-ordinated foodchain approach", Ploufragan, France. 10-12/9/06. Συμμετοχή με αναρτημένη ανακοίνωση (Poster).
2. Σακαρίδης, Ι., Σούλτος, Ν. και Κοϊδής Π. Συχνότητα της παρουσίας των *Salmonella* spp. σε σφάγια ορνιθίων κρεοπαραγωγής στη Βόρεια Ελλάδα. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής παραγωγικών ζώων, υγιεινής – ασφάλειας τροφίμων ζωικής προέλευσης & προστασίας του καταναλωτή. 14-16/3/08. Συμμετοχή με προφορική ανακοίνωση.
3. Sakaridis, I., Soutos, N. and Koidis, P. Prevalence of *Salmonella* and *Listeria* spp. in poultry carcasses in Northern Greece. 1st

Mediterranean Summit of WPSA: Advances and Challenges in Poultry Science. 7-10/5/08. Συμμετοχή στα πρακτικά του συνεδρίου.

4. Σακαρίδης, Ι., Σούλτος, Ν. και Κοϊδής Π. Συχνότητα της παρουσίας των *Listeria* spp. σε σφάγια ορνιθίων κρεοπαραγωγής στη Βόρεια Ελλάδα. 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Διεπιστημονικής Εταιρίας Διασφάλισης Υγιεινής Τροφίμων (Δ.Ε.Δ.Υ.Τ.). 6-8/6/08. Συμμετοχή με προφορική ανακοίνωση.
5. Sakaridis, I., Soultos, N. and Koidis, P. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* serovars from poultry carcasses in Northern Greece. European College of Veterinary Public Health (ECPVH) Conference 2009 “Veterinary Contributions to Public Health: Expectations, Opportunities and Implementations”. 8-9/10/09. Συμμετοχή με αναρτημένη ανακοίνωση (Poster)
6. Σακαρίδης, Ι., Σούλτος, Ν., Δόβας, Χ., Ιωσηφίδου, Ε., Κοϊδής, Π. και Αμβροσιάδης, Ι. Αντιμικροβιακή δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων κρεοπαραγωγής. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Διεπιστημονικής Εταιρίας Διασφάλισης Υγιεινής Τροφίμων (Δ.Ε.Δ.Υ.Τ.). 4-6/6/10. Συμμετοχή στα πρακτικά του συνεδρίου.
7. Σακαρίδης, Ι., Σούλτος, Ν., Δόβας, Χ., Παπαβέργου, Α., Αμβροσιάδης, Ι. και Κοϊδής, Π. Απομόνωση και ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων από σφάγια κοτόπουλου με ανασταλτική κατά *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes*. 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κτηνιατρικής παραγωγικών ζώων, υγιεινής – ασφάλειας τροφίμων ζωικής προέλευσης & προστασίας του καταναλωτή. 18-20/3/11. Συμμετοχή με προφορική ανακοίνωση.
8. Σακαρίδης, Ι., Σούλτος, Ν., Μπάτζιος, Χ., Αμβροσιάδης, Ι. και Κοϊδής, Π. Αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι των *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν από σφάγια ορνιθίων. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο

Τροφίμων. Σύγχρονη Προσέγγιση στην Υγιεινή και Ασφάλεια των Τροφίμων. 11-13/11/2011. Συμμετοχή με προφορική ανακοίνωση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Άλληλουχίες του rRNA γονιδίου των οξυγαλακτικών στελεχών που προσδιορίστηκαν:

Στέλεχος 5 (*Lactobacillus johnsonii*)

CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGGTGGGAT
AACCTTTATAGGAGTCAGCCGTCTAAGGTAGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAA
CAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAGGCGAAA
GATGATGGAGAGTGCAGAGACACTAAGAGAAGTCATCGAGAAAGCCAAGCGGAAGCA
CACTGAGAACTTTGTTTAGTTTTGAGGGTAATACCTCAAGAGCTAGTACATTGAAA
ACTGAATATAATCAAAAAGCAAAAAAACCGAGACAATCGAAAAACAGATTGAAGAGC
GACCGAGAAGAGAGAGAACTCAACTTGAAATAGGTCAAGTAGAAAAGGGCGCATGG
TGAATGCCTTGGCACTAGAAGCCGATGAAGGACGTGACGAACCACGAAAGGCTTCGG
GGAGCAGTAAGTAAGCAATGATCCGGAGATATCCGAATGGGGGAACCCAATACCGCG
AGGTATTATCATTAACCTGTTAAGGTTAATGAAGGAAGACGCAGTGAACCTGAAACATC
TAAGTAGCTGCAGGAAGAGAAAAGAAAAATCGATTTCCCAAGTAGCGGCGAGCGAACA
GGAAAGAGCCCAAACCAGCTGGCTTGCCAGTTGGGGTTGTAGGACTGCGATATAGTA
CTTGAAGTGATAGCAGAATTATCTGGAAAGATAAGCCAGAGAGGGTGAGAGCCCCGT
ACGCGAAATTGCGGAGAGACTTAGCAGGATCCTGAGTAGGTCGGGACACGAGGAATC
CCGATTGAAACCGCGAGGACCATCTCGCAAGGCTAAATACTA

Στέλεχος 7 (*Pediococcus acidilactici*)

GTTTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTACTCTCACTTTTGTTCCTTTGAAAACCTGAATAAT
ATCTATAATTTTCTAATTTTAATTAATCATAATTAACCGAGAGAAAACCGCGTAAT
TTTAAAGAGTTAAACAAGATTAGTTCAAATAATCGCAATACTCAATTAATCGCTTT
ACCGTAGGTAAAGTTAGGTTAAGTTAGGAAGGGCGCATGGTGGATGCCTTGGTACTA
GGAGCCGATGAAGGACGGGACTAACACCGATATGCCTCGGGGAGCTGTAAGTAAGCT
TTGATCCGGGGATTTCCGAATGGGGCAACCCAATAGTTTTAATCGACTATTATCCGC
ATCTGAATTCATAGGATGTGTGAAGGTAAACGTGGGGAACCTGAAACATCTCAGTACC
CACAGGAACAGAAAGAAAATTCGATTCCCTGAGTAGCGGCGAGCGAAACGGGAACAG
CCCAAACCAAGAAGCTTGCTTCTTGGGGTTGTAGGACTGAACATTTGAGTTACCAA
GAGCTTGATAGCTGAAGGGCTGGGAAGGCCAGCCAGAGAGGGTGACAGCCCCGTAA
GTTAAATCGAACTCCCTCAGTTCAGGATCCTGAGTACGGCGGAGCACGTGAAATTCC
GTCGGAATCCGGGAGGACCATCTCCCAAGGCTAAATACT

Στέλεχος 40 (*Lactobacillus salivarius*)

CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGGT
AACCGCAAGGAGCCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACA
AGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAATAATTACGG
AACCTGTACATTTATTGAATACTTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCATATCTCTCAAGAT
TTTGTTCCTTGAAAAC TAGATATTGATTTATTTCTTAAAAATAAACCGAGAACACCG
CGTTTTAAAGAGTTTAAAACAAGAATTATAGTTCTTAATCGCTAAACTCATAACCTA
TTATCGTTAGATAATATTAGGTTAAGTTATTAAGGGCGTATGGTGGATGCCTTGGCA
CTAGGAGCCGATGAAGGACGTGACTAACTGCGATATGCTTCGGGGAGTTGTAAGTAA
ACTATGATCCGGAGATTTCCGAATGGGGAAACCTAACAGGTTTTACCGCCTGTTATC
ACTAAGTGAATTCATAGCTTAGTTGAAGGTAGACGTGGGGAAC TGAACATCTAAGT
ACCCACAGGAAGAGAAAGAAATTCGATTCCTCAGTAGCGGCGAGCGAACCGGGAAG
AGCCCAAAC TAAGAAGCTTGCTTCTTAGGGTTGTAGGACTGAACATTTGAGTTACCA
AGAAACGAAGTAGTTGAATAATCTGGGAAGATTAGCCAAAGAGAGTGATAGCCTCGT
AAGCGAAACTTCGTTTCCTCAGTTCAGGATCCTGAGTACGGCGGAACACGTGAAACT
CCGTCGGAATCCGGGAGGACCATCTCCAAGGCTAAATACTA

Στέλεχος 48 (*Pediococcus acidilactici*)

CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGCCGGTGGGGT
AACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAAC
AAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAATAATACGG
AACCGCACACGAGTCAAAGTTTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCTACTCTCACTTTTGT
CTTTGAAAACCTGAATAATATCTATAATTTTCTAATTTTAATTAATCATAATTAAACC
GAGAGAAAACCGCGTAATTTTAAAGAGTTAAACAAGATTAGTTCAAATAATCGCAA
TACTCAATTAATCGCTTTACCGTAGGTAAAGTTAGGTAAAGTTAGGAAGGGCGCATG
GTGGATGCCTTGGTACTAGGAGCCGATGAAGGACGGGACTAACACCGATATGCCTCG
GGGAGCTGTAAGTAAGCTTTGATCCGGGGATTTCCGAATGGGGCAACCCAATAGTTT
TAATCGACTATTATCCGCATCTGAATTCATAGGATGTGTGAAGGTAAACGTGGGGAA
CTGAAACATCTCAGTACCCACAGGAACAGAAAGAAAATTCGATTCCCTGAGTAGCGG
CGAGCGAAACGGGAACAGCCCAAACCAAGAAGCTTGCTTCTTGGGGTTGTAGGACTG
AACATTTGAGTTACCAAAGAGCTTGATAGCTGAAGGGCCTGGGAAGGCCAGCCAGAG
AGGGTGACAGCCCCGTAAGTTAAATCAAACCTCCCTCAGTTCAGGATCCTGAGTACGG
CGGAGCACGTGAAATTCCGTGCGGAATCCGGGAGGACCATCTCCCAAGGCTAAATACT
ACCTAGTGACCGATAGTGAACCAGTACCGTGAGGGAAAGG

Στέλεχος 51 (*Lactobacillus paralimentarius*)

ACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCCTTCGGGGAAGTAGC
CGCCTAAGGTGGGACAAATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAA
CCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGATATGGTACTTTGGTACCAACGGAAATA
CACAATTGTTAAAACCTTTGTTTAGTTTTGAGGGGTCTACCCTCAAACCTCGTACCTTG
AAAACCTGGATATTAAGAATTAATGAATTAAGAAACACCCGAAAACCTGCGCGGCAATC
TTTTTGATTGCCAGCTGTGATGAAAATCATGGCAAATTGTTTTAAATTACTTTTTGT
AATTTAATTTAGGTTAAGTTATAAAGGGCGCACGGTGGATGCCTAGGCACTAGGAGC
CGATGAAGGACGTAACCTAACGACGATACGCCCTCGGGGAGCTGTAAGTAAGCTTTGAT
CCGGGGATTTCCGAATGGGGGAACCCAAATATCGTAATGGATATTTACTTGTCTGTG
AATACATAGCAGTCAAGAGGAACACGCAATGAACTGAAACATCTAAGTAGTTGCAGG
AAGAGAAAGAAAATTTCGATTCCTGAGTAGCGGCGAGCGAAACGGGAATAGCCCAA
CTAAAGAGCTTGCTCTTTAGGGTTGTAGGACTGATGTTGTGAGAACAAAAGGTTATG
ATAGTCGAACAAGTTGGAAAACCTTGGCCAAAGAGAGTGAAAGCCTCGTAAACGAAAT
CTGATCCACTCCATTCAGTATCCTGAGTACGGCGGAACACGAGAAACTCCGTCGGAA
TCCGGGAGGACCATCTCCCAAGGCTAAATACTCCCTAGTGACCGATAGTGAAC

Στέλεχος 59 (*Lactobacillus salivarius*)

CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGGT
AACCGCAAGGAGCCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACA
AGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAATAATTACGG
AACCTGTACATTTATCGAATACTTTGTTTAGTTTTGAGAGGTCATATCTCTCAAGAT
TTTGTTCCTTTGAAAAC TAGATATTGATTTATTTCTTAAAAATAAACCGAGAACACCG
CGTTTTAAAGAGTTTAAAACAAGAATTATAGTTCTTAATCGCTAAACTCATAACCTA
TTATCGTTAGATAATATTAGGTTAAGTTATTAAGGGCGTATGGTGGATGCCTTGGCA
CTAGGAGCCGATGAAGGACGTGACTAACTGCGATATGCTTCGGGGAGTTGTAAGTAA
ACTATGATCCGGAGATTTCCGAATGGGGAAACCTAACAGGTTTTACCGCCTGTTATC
ACTAAGTGAATTCATAGCTTAGTTGAAGGTAGACGTGGGGAAC TGAACATCTAAGT
ACCCACAGGAAGAGAAAGAAATTCGATTCCTCAGTAGCGGCGAGCGAACCGGGAAG
AGCCCAAAC TAAGAAGCTTGCTTCTTAGGGTTGTAGGACTGAACATTTGAGTTACCA
AGAAATGAAGTAGTTGAATAATCTGGGAAGATTAGCCAAAGAGAGTGATAGCCTCGT
AA

Στέλεχος 74 (*Lactobacillus reuteri*)

CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAACGCCCAAAGTCGGTGGCCT
AACCTTTATGGAGGGAGCCGCCTAAGGCGGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC
AAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAATAAAACGG
AACCTACACATCGAAGAACTTTGTTTAGTTTTGAGGGGTTTACCCTCAGAGCTTGT
ACTTTGAAAATAAATACTATCTAATTTCTTTATTAACAAAACAATAAACCGAGAAC
ACCGCGTTATTTGAGTTTTAATTAACGAATTATAATCGCTAACTCAATTAATCAGAC
AATCTTTGATTGTTTAGGTTAAGTTATGAAGGGCGCATGGTGAATGCCTTGGTACTA
GGAGCCGATGAAGGACGGGACTAACACCGATATGCTTCGGGGAGCGGTAAGTACGCT
TTGATCCGGAGATTTCCGAATGGGGCAACCCAATCAGCTTAGTCGCTGATTACTTGA
CTAGTGAATACATAGCTAGCAAGAGGTAGACGCAGTGAACGAAACATCTTAGTAGC
TGCAGGAAGAGAAAGAAACATCGATTCCCTGAGTAGCGGCGAGCGAAAAGGGAAGAG
CCCAAACCAACAAGCTTGCTTGTTGGGGTTGTAGGACTGAACATTAGAGTTACCAA
GTGCGACGTA