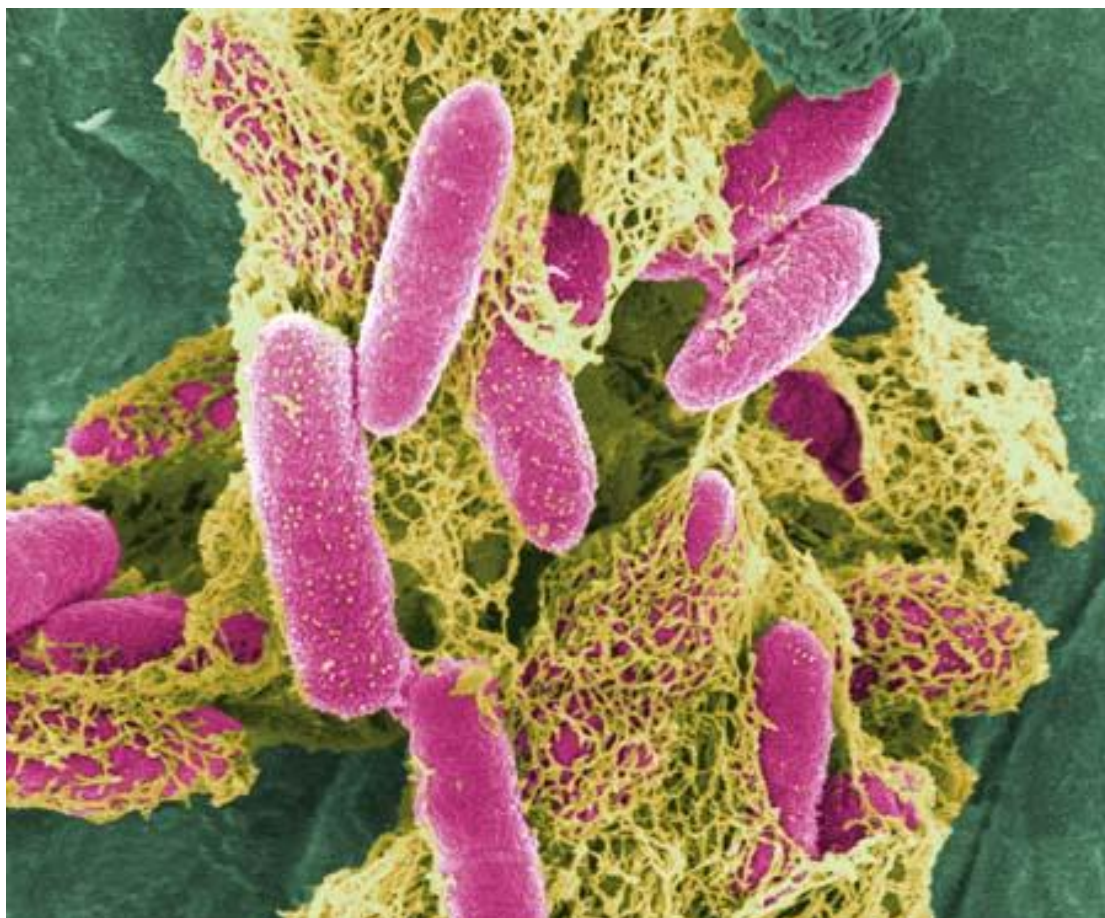


**Α.Τ.Ε.Ι. ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:
«Ανίχνευση της *Escherichia coli* και του *Clostridium perfringens* σε
νωπό κιμά»



ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΤΖΗΚΑΣ ΖΗΣΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΜΑΚΡΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2009

3.1.2. Κατανομή στη φύση	34
3.1.3. Ανθεκτικότητα	34
3.1.4. Καλλιεργητικά χαρακτηριστικά	34
3.1.5. Αντιγόνα	34
3.1.6. Τοξίνες	35
3.1.7. Εντεροτοξίνες	35
3.1.8. Παθογόνος δράση	36
3.1.9. Εργαστηριακή διάγνωση	37
3.1.10. Πρόληψη	37
3.2. Ανίχνευση στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης	
(παλαιότερες μέθοδοι)	38
3.2.1. Παλαιότερες μέθοδοι (τεχνικές)	38
3.2.1.1. Μέθοδος πολλαπλών σωλήνων ή μέθοδος MPN (Most Probable Number Method)	38
3.2.1.2. Μέθοδος ενσωματώσεως	42
3.2.1.3 Μέθοδος μικροβιοκρατών μεμβρανών (Membrane Filtration Method)	43
3.3. ISO 16649-2	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	48
4.1. Γενικά - Ιδιότητες	48
4.1.1. Μορφολογία	48
4.1.2. Κατανομή στη φύση	48
4.1.3. Ανθεκτικότητα	48
4.1.4. Αντιγόνα	49
4.1.5. Τοξίνες	49
4.1.6. Παθογόνος δράση	50
4.1.7. Εργαστηριακή διάγνωση	51
4.1.8. Πρόληψη	51
4.2. Ανίχνευση στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης	
(παλαιότερες μέθοδοι)	52
4.2.1. Παλαιότερες μέθοδοι (τεχνικές)	52
4.2.1.1 Μέθοδος ενσωματώσεως	52
4.2.1.2 Μέθοδος επιφανειακής εξαπλώσεως	54

4.2.1.3 Μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων	54
4.2.1.4 Μέθοδοι αναεροβιώσεως	55
4.3. ISO 7937:1997	57
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	59

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή έγινε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο: “Μικροβιολογική κατάσταση νωπού κιμά στην περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας – Αναζήτηση των *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* και *Clostridium perfringens* στο νωπό κιμά και μελέτη της αντιβιοτικοαντοχής τους” με επιστημονική υπεύθυνη την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ελευθεριάδου Αναστασία.

Αισθάνομαι υποχρεωμένη να ευχαριστήσω την κ. Ελευθεριάδου Αναστασία, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στο πρόγραμμα, εμπλουτίζοντας έτσι τις γνώσεις μου πάνω στη μικροβιολογία των τροφίμων και στην εργαστηριακή πρακτική γενικότερα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου κ. Τζήκα Ζήση που είχε την επιμέλεια της εργασίας αυτής, για την εκπαίδευσή μου στο χώρο του εργαστηρίου καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά του στην εύρεση βιβλιογραφίας, καθώς και στη συνολική καθοδήγησή του για τον τρόπο διάρθρωσης και συγγραφής της. Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή Κτηνιατρικής Κοΐδη Παύλο, Διευθυντή Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κτηνιατρικής Σούλτο Νικόλαο, για τη συνολική μέριμνα και βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΚΙΜΑΣ

1.1. Γενικά

Το σύγκοπτο κρέας ή μυττωτός κρέατος ή κιμάς είναι κρέας αποστεωμένο, νωπό ή κατεψυγμένο, το οποίο έχει υποστεί λεπτό τεμαχισμό μέσω ειδικών κρεατοκοπτικών μηχανών ή με τα χέρια με τη βοήθεια μαχαιριού.

Ο κιμάς προέρχεται συνήθως από βοδινό ή χοιρινό κρέας αλλά παρασκευάζεται και από κρέας άλλων ζώων θηλαστικών ή πτηνών αναλόγως του προϊόντος το οποίο πρόκειται να παρασκευαστεί και των τοπικών συνηθειών.

Παλαιότερα, ο κιμάς προερχόταν από κρέας καλής ποιότητας και προοριζόταν κυρίως για παιδιά και ηλικιωμένους, οι οποίοι αδυνατούσαν να μασήσουν ακέραιο τεμάχιο κρέατος.

Σήμερα, όμως ο κιμάς παρασκευάζεται από κάθε είδος κρέατος και η παρασκευή του έχει ως σκοπό:

- Να διευκολυνθεί η κατανάλωση κρέατος από ηλικιωμένα άτομα και παιδιά τα οποία δεν έχουν βγάλει δόντια.
- Να διευκολυνθεί η πώληση τεμαχίων ή υπολειμμάτων κρεοπωλείων τα οποία δεν μπορούν να πωληθούν ως έχουν π.χ. τεμαχίδια κρέατος, ξέσματα οστών κ.λπ.
- Να διευκολυνθεί η αξιοποίηση κρεάτων τα οποία προέρχονται από γερασμένα ή ισχνά ζώα και κρεάτων πλούσιων σε συνδετικό ιστό (κρέατα δεύτερης και τρίτης κατηγορίας), τα οποία δύσκολα αξιοποιούνται με άλλο τρόπο.

Ο κιμάς παρασκευάζεται:

- ❖ Στο σπίτι, από την νοικοκυρά για οικιακή χρήση.
- ❖ Στα κρεοπωλεία, από τον κρεοπώλη. Ο κιμάς προορίζεται για έναν συγκεκριμένο πελάτη και απαγορεύεται να συντηρείται έτοιμος στα κρεοπωλεία. Επιβάλλεται να κόπτεται την στιγμή της ζήτησης του και παρουσία του πελάτη. Μέσα στο κρεοπωλείο πρέπει να υπάρχει αναρτημένη πινακίδα στην οποία να αναγράφεται: **“Ο κιμάς κόπτεται παρουσία του πελάτη”**. Αυτό συμβαίνει, λόγω της δύσκολης συντήρησης του κιμά καθώς και της εύκολης νοθείας του με άλλα τεμάχια του ίδιου ή άλλων σφαγίων, με άφθονο συνδετικό ιστό ή και εσωτερικών οργάνων, εδώδιμων και μη εδώδιμων.

- ❖ Στα ειδικά καταστήματα παρασκευής και συσκευασίας κιμά, σε μεγάλες ποσότητες και συσκευάζεται μέσα σε πλαστικές σακούλες, ορισμένου βάρους, αυτούσιος ή αναμειγμένος με άλλες ουσίες και συντηρείται στην ψύξη ή στην κατάψυξη έτοιμος για μαγείρεμα.

Η υγιεινή συντήρηση του κιμά έχει ως εξής:

Κατά την παρασκευή του γενικώς, πρέπει να αποβάλλονται πλην των οστών και των χόνδρων, οι τένοντες, οι περιτονίες, τα μεγάλα αγγεία καθώς και το περιττό λίπος. Απαγορεύεται η ανάμειξη εσωτερικών οργάνων, εκτός ειδικών περιπτώσεων παρασκευής ειδικών προϊόντων.

Επίσης, θα πρέπει να ελέγχονται οι κρεατοκοπτικές μηχανές ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα κρέατος από προηγούμενη χρήση, τα οποία μπορεί να είναι μολυσμένα. Οι κρεατοκοπτικές μηχανές πρέπει να πλένονται μετά από κάθε χρήση με ζεστό νερό και να απολυμαίνονται. Τέλος, κατά τη συγκοπή του κρέατος, θα πρέπει το κρέας να μην συνθλίβεται αλλά να κόβεται, διότι χάνει τον οπό του.

Ο κιμάς διατίθεται κυρίως σε τρεις μορφές:

- 1) Νωπός κιμάς
- 2) Κατεψυγμένος κιμάς
- 3) Υπό μορφή κρεατοσκευασμάτων

Κάθε μια από αυτές τις μορφές, έχει τον ίδιο τρόπο παρασκευής και την ίδια υγιεινή. **(Πανέτσος 1978).**

1.1.1. Όροι για την παραγωγή του κιμά

Το κρέας πρέπει να υποβάλλεται σε εξέταση πριν το άλεσμα ή τον τεμαχισμό. Όλα τα ρυπασμένα ή ύποπτα τμήματα αφαιρούνται και κατακρατούνται πριν από το άλεσμα του κρέατος. Ο κιμάς δεν πρέπει να λαμβάνεται από υπολείμματα του τεμαχισμού ή της προετοιμασίας ούτε από μηχανικώς διαχωρισμένο κρέας. **(ΦΕΚ, π.δ/μα 289/1997 (Α' 210)).**

Συγκεκριμένα, ο κιμάς δεν πρέπει να παρασκευάζεται από κρέατα τα οποία χαρακτηρίζονται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση από τον επίσημο κτηνίατρο.

A. Ακατάλληλο είναι το κρέας που προέρχεται από ζώα στα οποία έχει διαπιστωθεί μια από τις ακόλουθες ασθένειες:

- Γενικευμένη ακτινοβακίλλωση ή ακτινομύκωση
- Βακτηριδιακός άνθρακας ή συμπτωματικός άνθρακας
- Γενικευμένη φυματίωση
- Γενικευμένη λεμφαδενίτιδα
- Μάλη
- Λύσσα
- Τέτανος
- Οξεία σαλμονέλωση
- Οξεία βρουκέλωση
- Ερυσιπέλας
- Μποτουλινισμός
- Σηψαιμία
- Πυαιμία, τοξιναιμία ή ιαιμία

B. Επίσης, ο κιμάς δεν πρέπει να παρασκευάζεται από κρέατα τα οποία παρουσιάζουν οξέα συμπτώματα βρογχοπνευμονίας, πλευρίτιδας, περιτονίτιδας, μητρίτιδας, μαστίτιδας, αρθρίτιδας, περικαρδίτιδας, εντερίτιδας ή μηνιγγοεγκεφαλομυελίτιδας, επιβεβαιωμένα από λεπτομερή εξέταση, η οποία συμπληρώνεται, ενδεχομένως από βακτηριολογική εξέταση και την ανίχνευση καταλοίπων ουσιών με φαρμακολογική δράση.

Αν τα αποτελέσματα των εξετάσεων αυτών είναι ευνοϊκά το κρέας χαρακτηρίζεται κατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση.

Γ. Ακατάλληλο προς ανθρώπινη κατανάλωση κρίνεται το κρέας το οποίο προέρχεται από ζώα τα οποία έπασχαν από τις παρακάτω παρασιτικές ασθένειες:

- Γενικευμένη σαρκοσποριδίαση
- Γενικευμένη κυστικέρκωση ή τριχινίαση

Δ. Ακόμα το κρέας των ζώων τα οποία:

- Ήταν νεκρά ή θνησιγενή ή από νεκρά έμβρυα
- Εσφάγησαν σε πολύ μικρή ηλικία και έχουν οίδηματώδες κρέας
- Παρουσιάζουν καχεξία ή έντονη αναιμία

- Παρουσιάζουν πολλαπλούς όγκους, αποστήματα ή σοβαρά τραύματα, σε διάφορα σημεία του σφαγίου ή σε διάφορα εντόσθια.

Ε. Ακατάλληλο κρίνεται το κρέας των ζώων τα οποία:

- Παρουσίασαν θετική ή ύποπτη αντίδραση στη φυματίνη και στα οποία μετά από εξέταση που διενεργείται, διαπιστώνονται εντοπισμένες φυματικές αλλοιώσεις σε διάφορα όργανα ή σημεία του σφαγίου. Αν διαπιστώνεται φυματική αλλοίωση σε λεμφαδένες ενός μόνο συγκεκριμένου οργάνου ή τμήματος του σφαγίου, χαρακτηρίζονται ως ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση μόνο το προσβεβλημένο όργανο ή τμήμα σφαγίου και οι αντίστοιχοι λεμφαδένες.
- Παρουσίασαν θετική ή ύποπτη αντίδραση στη βρουκέλωση, η οποία βεβαιώνεται από αλλοιώσεις που υποδηλώνουν οξεία πάθηση. Ακόμη και στην περίπτωση κατά την οποία δεν διαπιστώνεται καμία από τις μακροσκοπικές αυτές αλλοιώσεις, οι μαστοί, το γεννητικό σύστημα και το αίμα χαρακτηρίζονται ως ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση.

ΣΤ. Επίσης, κρίνονται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση τα μέρη των σφαγίων που παρουσιάζουν σημαντική ορώδη ή αιμορραγική διήθηση, εντοπισμένα αποστήματα ή εντοπισμένες μολύνσεις κ.α. Ακόμα:

- Τα παραπροϊόντα και τα εντόσθια που παρουσιάζουν παθολογικές μολυσματικές, παρασιτικές ή τραυματικές αλλοιώσεις.
- Το κρέας το οποίο προέρχεται από ζώα με πυρετό καθώς και το κρέας που παρουσιάζει σοβαρές ανωμαλίες σχετικά με το χρώμα, την οσμή, τη σύσταση και τη γεύση.

Ζ. Όταν ο επίσημος κτηνίατρος διαπιστώνει ότι ένα σφάγιο ή ένα παραπροϊόν έχει προσβληθεί από τυρώδη λεμφαδενίτιδα ή άλλη διαπυητική πάθηση, μη γενικευμένη, είτε συνοδεύεται είτε όχι από καχεξία, τότε ακατάλληλα προς ανθρώπινη κατανάλωση κρίνονται:

- Το όργανο και ο αντίστοιχος λεμφαδένας, αν η ανωτέρω περιγραφόμενη πάθηση παρουσιάζεται στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό αυτού του οργάνου ή λεμφαδένα και
- Σε όλες τις περιπτώσεις στις οποίες δεν εφαρμόζεται το παραπάνω σημείο, η αλλοίωση και όλα τα μέρη που την περιβάλλουν για τα οποία ο επίσημος

κτηνίατρος κρίνει ότι πρέπει να κατασχεθούν, λαμβανόμενης υπόψη της ηλικίας και του βαθμού δραστηριότητας της αλλοίωσης. Μια παλαιά αλλοίωση σταθερά εγκυστωμένη, μπορεί να θεωρείται ως ανενεργός.

Η. Το κρέας που προέρχεται από τον καθαρισμό τραυμάτων αφαιμάξης.

Θ. Όταν ο επίσημος κτηνίατρος διαπιστώνει ότι ένα σφάγιο ή μέρος του σφαγίου ή ένα παραπροϊόν είναι προσβεβλημένο από ασθένεια ή άλλη πάθηση από εκείνες που αναφέρονται στις προηγούμενες περιπτώσεις, ολόκληρο το σφάγιο και τα παραπροϊόντα ή το μέρος του σφαγίου ή το παραπροϊόν που ο επίσημος κτηνίατρος κρίνει αναγκαίο να χαρακτηριστεί ως ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση. Επίσης, τα σφάγια των οποίων τα παραπροϊόντα δεν έχουν υποβληθεί σε εξέταση μετά τη σφαγή.

Ι. Το αίμα του ζώου του οποίου το κρέας έχει χαρακτηριστεί ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση καθώς και το αίμα που μολύνθηκε από το περιεχόμενο του στομάχου ή από οποιαδήποτε άλλη ουσία.

Κ. Το κρέας των ζώων στα οποία έχουν χορηγηθεί:

- Προϊόντα που ενδέχεται να καταστήσουν το κρέας επικίνδυνο ή επιβλαβές για την δημόσια υγεία και ως προς τα οποία πρέπει να ληφθεί απόφαση με κοινοτική διαδικασία.
- Τρυφεροποιητές.
- Το κρέας που περιέχει κατάλοιπα ουσιών επιτρεπόμενων, κατάλοιπα φαρμάκων, αντιβιοτικών, φυτοφαρμάκων ή άλλων ουσιών επιβλαβών ή δυνάμεων να καταστήσουν την κατανάλωση του κρέατος επικίνδυνη ή επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία, εφόσον τα εν λόγω κατάλοιπα υπερβαίνουν τα αποδεκτά όρια ανοχής που καθορίζονται από την ισχύουσα νομοθεσία.
- Το κρέας που έχει μολυνθεί ή αλλοιωθεί σε βαθμό που θα καθοριστεί με την κοινοτική διαδικασία.
- Τα συκώτια και τα νεφρά ζώων ηλικίας άνω των δύο ετών που προέρχονται από περιοχές στις οποίες, χάρη στην εκτέλεση ορισμένων προγραμμάτων, διαπιστώνεται η γενικευμένη παρουσία βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον.
- Το κρέας το οποίο έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με ιονίζουσες ή υπεριώδεις ακτινοβολίες.

- Το κρέας που παρουσιάζει έντονη την οσμή του φύλλου.
(ΦΕΚ, π.δ/μα 410/1994 (Α' 231)).

Λ. Από κρέας που προέρχεται από τα εξής μέρη βοοειδών, χοίρων ή αιγοπροβάτων:

Κρέας κεφαλής εκτός από τους μασητήρες και το μη μυώδες τμήμα της λευκής γραμμής (Linea alba), περιοχή του ταρσού και του καρπού, υπολείμματα κρέατος αποξεσμένα από τα οστά. Οι μύες του διαφράγματος-μετά την αφαίρεση των ορογόνων υμένων- και οι μασητήρες μπορούν να χρησιμοποιούνται μόνον κατόπιν ανίχνευσης της κυστικέρκωσης. Τα νωπά κρέατα δεν πρέπει να περιέχουν θραύσματα οστών.

Όταν η εκτέλεση των εργασιών που πραγματοποιούνται μεταξύ της εισαγωγής του κρέατος στους χώρους παραγωγής κιμά και της υποβολής του τελικού προϊόντος στην επεξεργασία ψύξης ή υπερψύξης δεν διαρκεί περισσότερο από μια ώρα, η θερμοκρασία στο κέντρο του κρέατος δεν πρέπει να υπερβαίνει τους +17°C, η δε θερμοκρασία των χώρων παραγωγής τους +12°C.

Η αρμόδια Νομαρχιακού επιπέδου Κτηνιατρική Αρχή μπορεί να επιτρέπει μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για τις επιμέρους περιπτώσεις κατά τις οποίες η προσθήκη άλατος δικαιολογείται για τεχνολογικούς λόγους, υπό την προϋπόθεση ότι, με την παρέκκλιση αυτή, δεν θίγονται οι υγειονομικοί κανόνες.

Όταν η εκτέλεση των εν λόγω εργασιών διαρκεί περισσότερο από μια ώρα ή από το χρονικό διάστημα που επιτρέπει η Νομαρχιακού επιπέδου Κτηνιατρική Αρχή, το νωπό κρέας μπορεί να χρησιμοποιείται μόνο αφού η θερμοκρασία στο κέντρο του μειωθεί στους +4°C το πολύ.

Ο κιμάς δεν πρέπει να υφίσταται μια μόνο υπέρψυξη. Αμέσως μετά την παραγωγή, ο κιμάς πρέπει να τίθεται σε πρώτη συσκευασία κατά τρόπο σύμφωνο προς τους κανόνες υγιεινής και έπειτα από τη δεύτερη συσκευασία να διατίθεται υπό μίαν από τις παρακάτω μορφές και θερμοκρασίες αλλά και να αποθηκεύεται στις θερμοκρασίες αυτές:

- ❖ ΜΕ ΤΗ ΜΟΡΦΗ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΥΠΟ ΨΥΞΗ: Θα πρέπει να ψύχεται με τέτοιο τρόπο ώστε η θερμοκρασία στο κέντρο του να κατέβει κάτω από τους +2°C. Για την επιτάχυνση της ψύξεως επιτρέπεται η προσθήκη περιορισμένης ποσότητας

κατεψυγμένου κρέατος, με την προϋπόθεση ότι η προσθήκη αυτή αναφέρεται στην ετικέτα. Στην περίπτωση αυτή το χρονικό όριο που αναφέρθηκε πιο πάνω πρέπει να περιορίζεται σε μια ώρα το ανώτερο.

- ❖ **ΜΕ ΤΗ ΜΟΡΦΗ ΥΠΕΡΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΥ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ:** Στην περίπτωση αυτή, ο κιμάς θα πρέπει να παρασκευάζεται από γραμμωτούς μύες (συμπεριλαμβανομένων και των παρακείμενων λιπωδών ιστών) με εξαίρεση τον μυ της καρδιάς και να ψύχεται έτσι ώστε η θερμοκρασία στο κέντρο του να κατέβει κάτω από τους -18°C το συντομότερο δυνατόν.

1.1.2. Εμπορία του κιμά

Η αρμόδια Κεντρική Διεύθυνση Κτηνιατρικής του Υπουργείου Γεωργίας μεριμνά ώστε να τίθεται σε εμπορία μόνο το νωπό κρέας βοοειδών, χοιρινών και αιγοπροβάτων, το οποίο διατίθεται με μορφή κιμά και ανταποκρίνεται στους εξής όρους:

A. Να έχει παρασκευαστεί από γραμμωτούς μύες (συμπεριλαμβανομένων και των παρακείμενων λιπωδών ιστών) με εξαίρεση τον μυ της καρδιάς. Εάν πρόκειται για νωπό χοιρινό κρέας, θα πρέπει να έχει υποβληθεί σε δοκιμασία για την ανίχνευση τριχινών ή σε ψυκτική επεξεργασία.

B. Να έχει παρασκευαστεί σύμφωνα με τους όρους παραγωγής κιμά σε εργαστήριο παρασκευής το οποίο να ανταποκρίνεται στους ειδικούς όρους έγκρισης των εγκαταστάσεων παραγωγής κιμά, να έχει λάβει έγκριση και να περιλαμβάνεται στον ή στους καταλόγους που καταρτίζονται.

Γ. Να έχει ελεγχθεί σύμφωνα με τις διατάξεις περί των ελέγχων του κιμά.

Δ. Να φέρει σήμα και ετικέτα καταλληλότητας του κιμά

Ε. Να έχει συσκευαστεί και να έχει αποθηκευτεί με τρόπο που προβλέπουν οι διατάξεις για τον κιμά, καθώς και να μεταφέρεται με τρόπο αντίστοιχο.

ΣΤ. Κατά τη μεταφορά πρέπει να συνοδεύονται:

1. Από εμπορικό συνοδευτικό έγγραφο.

- Να έχει καταρτιστεί από την εγκατάσταση αποστολής.
- Να αναγράφει τον αριθμό κτηνιατρικής έγκρισης της εγκεκριμένης εγκατάστασης και για τον κατεψυγμένο κιμά, ευανάγνωστη ένδειξη του μήνα και του έτους κατάψυξης.

- Να διατηρείται από τον παραλήπτη, προκειμένου να μπορεί να υποβληθεί κατόπιν σχετικής αιτήσεως, στη Νομαρχιακού επιπέδου Κτηνιατρική Αρχή.

Σε περίπτωση μηχανογραφημένων πληροφοριών, αυτές πρέπει να εκτυπώνονται, έπειτα από αίτηση της εν λόγω Αρχής. Επίσης, θα πρέπει να χορηγείται υγειονομικό πιστοποιητικό όταν τα κρέατα προορίζονται για εξαγωγή προς τρίτη χώρα, μετά το άλεσμα. Τα έξοδα αυτής της πιστοποίησης βαραίνουν τους εμπορευόμενους.

2. Από πιστοποιητικό καταλληλότητας κιμά, αν πρόκειται για κιμά που προορίζεται για άλλο κράτος-μέλος, αλλά πρόκειται να διαμετακομιστεί με σφραγισμένο φορτηγό μέσω τρίτης χώρας.

Εκτός από τα παραπάνω, ο κιμάς πρέπει να ανταποκρίνεται και στις ακόλουθες απαιτήσεις:

A. Το νωπό κρέας που χρησιμοποιείται για την παρασκευή πρέπει:

- **Όταν είναι κατεψυγμένο ή υπερκατεψυγμένο,** να λαμβάνεται από νωπό αποστεωμένο κρέας το οποίο έχει αποθηκευτεί μέχρι δεκαοχτώ μήνες για το βόειο κρέας, δώδεκα μήνες για το πρόβειο και έξι μήνες για το χοιρινό κρέας, μετά την κατάψυξη ή την υπερκατάψυξή τους, σε ψυκτική αποθήκη εγκεκριμένη.
- **Όταν διατηρείται με απλή ψύξη,** να χρησιμοποιείται:

Εντός έξι ημερών το βραδύτερο μετά τη σφαγή των ζώων ή

Εντός δεκαπέντε ημερών το βραδύτερο μετά τη σφαγή των ζώων για το αποστεωμένο βόειο κρέας το οποίο είναι συσκευασμένο στο κενό.

B. Πρέπει να έχει υποβληθεί σε ψυκτική επεξεργασία μέσα σε μια ώρα το βραδύτερο μετά τον τεμαχισμό σε μερίδες και την πρώτη συσκευασία εκτός και αν χρησιμοποιούνται μέθοδοι για τις οποίες απαιτείται πτώση της εσωτερικής θερμοκρασίας του κρέατος κατά την παρασκευή του.

Γ. Πρέπει να είναι συσκευασμένος και να διατίθεται υπό μίαν από τις εξής μορφές:

1. Με τη μορφή προϊόντος υπό απλή ψύξη.
2. Με τη μορφή υπερκατεψυγμένου προϊόντος.

Δ. Δεν πρέπει να έχει υποστεί επεξεργασία με ιονίζουσες ή υπεριώδεις ακτινοβολίες.

E. Οι ονομασίες που υπάρχουν στα κριτήρια σύνθεσης, δίπλα στις οποίες αναφέρεται ενδεχομένως και το είδος του ζώου του οποίου έχει χρησιμοποιηθεί το κρέας, πρέπει να αναγράφονται στην προσσκευασία μόνον εφόσον τηρούνται οι απαιτήσεις των κριτηρίων σύνθεσης, για τις εν' λόγω ονομασίες. **(ΦΕΚ, π.δ/μα 289/1997 (Α' 210)).**

1.1.3. Σήμανση και ετικετάρισμα του κιμά

Ο κιμάς πρέπει να φέρει στην πρώτη ή τη δεύτερη συσκευασία σήμα καταλληλότητας. Η σήμανση καταλληλότητας για τον κιμά πρέπει να είναι:

- A.** Είτε ωσειδής σφραγίδα, πλάτους τουλάχιστον 6,5 εκ. και ύψους 4,5 εκ. Επί της σφραγίδας πρέπει να αναγράφονται με απολύτως ευανάγνωστους χαρακτήρες οι κατωτέρω ενδείξεις:
- I. Στο άνω τμήμα, το όνομα «ΕΛΛΑΣ», εφόσον πρόκειται για κρέατα που υπέστησαν τον έλεγχο σε ελληνικά σφαγεία ή το όνομα του κράτους μέλους όπου έχει την έδρα της η εγκατάσταση στην οποία έγινε ο υγειονομικός έλεγχος των κρεάτων.
 - II. Στο κέντρο, ο αριθμός κτηνιατρικής έγκρισης της εγκατάστασης.
 - III. Στο κάτω τμήμα, το αρκτικόλεξο EOK για τα εγχώρια σφαζόμενα ή ένα από τα αρκτικόλεξα CEE, EOF, EWG, EEC, ή EEG, για τα κρέατα που έχουν ελεγχθεί σε εγκαταστάσεις άλλου κράτους-μέλους.
- B.** Είτε ωσειδής σφραγίδα, πλάτους τουλάχιστον 6,5 εκ. και ύψους 4,5 εκ. Επί της σφραγίδας πρέπει να αναγράφονται με απολύτως ευανάγνωστους χαρακτήρες οι κατωτέρω ενδείξεις:
- I. Στο άνω τμήμα, το σήμα που χαρακτηρίζει τη χώρα αποστολής, με κεφαλαία, δηλαδή: EL για τα κρέατα που ελέγχονται σε ελληνικά σφαγεία ή B – DK – D – E – F – IRL – I – L – NL – P - UK, για τα κρέατα που έχουν ελεγχθεί σε σφαγεία άλλου κράτους-μέλους, ακολουθούμενο από τον αριθμό κτηνιατρικής έγκρισης της εγκατάστασης.
 - II. Στο κάτω τμήμα, το αρκτικόλεξο EOK για τα εγχώρια σφαζόμενα ή ένα από τα αρκτικόλεξα CEE, EOF, EWG, EEC, ή EEG, για τα κρέατα που έχουν ελεγχθεί σε εγκαταστάσεις άλλου κράτους-μέλους.
- Οι χαρακτήρες πρέπει να έχουν ύψος τουλάχιστον 0,8 εκ. για τα γράμματα και τουλάχιστον 1 εκ. για τα ψηφία.

Η σήμανση καταλληλότητας δύναται επιπλέον, να περιλαμβάνει ένδειξη που να επιτρέπει την εξακρίβωση της ταυτότητας του κτηνιάτρου που έχει διενεργήσει την υγειονομική επιθεώρηση του κρέατος. **(ΦΕΚ, π.δ/μα 410/1994 (Α' 231)).**

Για την παραγωγή κιμά σε αυτόνομη μονάδα παραγωγής, το σήμα καταλληλότητας πρέπει να περιλαμβάνει τον αριθμό έγκρισης που απονέμει η

αρμόδια Κεντρική Διεύθυνση Κτηνιατρικής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

Η διεξαγωγή των ελέγχων οφείλεται να γίνεται κατά τρόπο ορατό και ευανάγνωστο επί της δεύτερης συσκευασίας, εφόσον τούτο δεν προκύπτει σαφώς από την ονομασία πωλήσεως του προϊόντος ή τον κατάλογο συστατικών ή το/τα είδη από τα οποία προέρχεται το κρέας και σε περίπτωση μείγματος το ποσοστό κάθε είδους. **(ΦΕΚ, π.δ/μα 289/1997 (Α' 210)).**

Για τις δευτέρες συσκευασίες που δεν προορίζονται για τον τελικό καταναλωτή, πρέπει να αναγράφεται η ημερομηνία παρασκευής **(Κώδικας Τροφίμων και Ποτών - Άρθρο 11).**

Για τον κιμά και τα παρασκευάσματα κρέατος που λαμβάνονται από κιμά, εκτός των νωπών λουκάνικων και του κρέατος για λουκάνικα, που φέρει σήμα καταλληλότητας, η ετικέτα πρέπει να φέρει τις εξής ενδείξεις:

- «Περιεκτικότητα σε λίπος κάτω των...»
- «Σε σχέση κολλαγόνου προς πρωτεΐνες κρέατος κάτω του...»

1.1.4. Πρώτη και δεύτερη συσκευασία του κιμά

Η δεύτερη συσκευασία (π.χ. ξυλοκιβώτια, χαρτοκιβώτια, πρέπει να ανταποκρίνεται σε όλους τους κανόνες υγιεινής και ιδίως:

- Δεν πρέπει να αλλοιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κιμά.
- Δεν πρέπει να μπορεί να μεταδώσει στον κιμά, ουσίες επιβλαβείς για την ανθρώπινη υγεία.
- Πρέπει να είναι αρκετά στερεή ώστε να εξασφαλίζει την αποτελεσματική προστασία του κιμά κατά τη μεταφορά και τους χειρισμούς.

Η δεύτερη συσκευασία δεν πρέπει να επαναχρησιμοποιείται για την συσκευασία του κιμά, εκτός αν είναι από ανοξείδωτο υλικό που καθαρίζεται εύκολα και αν έχει προηγουμένως καθαριστεί και απολυμανθεί.

Ο κιμάς που φέρει πρώτη συσκευασία πρέπει να συσκευάζεται σε δεύτερη συσκευασία. Ωστόσο αν η πρώτη συσκευασία ανταποκρίνεται σε όλες τις προστατευτικές προϋποθέσεις της δεύτερης συσκευασίας, δεν πρέπει να είναι διαφανής ή άχρωμη και δεν είναι απαραίτητο να τίθεται εντός δεύτερου περιέκτη εφόσον δεν αλλοιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κιμά, δεν μεταδίδει

στον κιμά επιβλαβείς ουσίες για την ανθρώπινη υγεία και τέλος αν είναι αρκετά στερεή ώστε να εξασφαλίζει την αποτελεσματική προστασία του κιμά κατά τη μεταφορά και τους χειρισμούς.

1.1.5. Αποθήκευση του κιμά

Ο κιμάς πρέπει να ψύχεται αμέσως μετά την πρώτη και / ή τη δεύτερη συσκευασία. Ο κιμάς πρέπει να αποθηκεύεται στις παρακάτω θερμοκρασίες ανάλογα με την μορφή την οποία διατίθεται. Δηλαδή:

- ❖ ΜΕ ΤΗ ΜΟΡΦΗ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ ΥΠΟ ΑΠΛΗ ΨΥΞΗ: Πρέπει να ψύχεται με τέτοιο τρόπο ώστε η θερμοκρασία στο κέντρο του να κατεβαίνει κάτω από τους +2°C, το συντομότερο δυνατόν.
- ❖ ΜΕ ΤΗ ΜΟΡΦΗ ΥΠΕΡΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΥ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ: έτσι, ώστε η θερμοκρασία στο κέντρο του να κατέβει κάτω από τους -18°C το συντομότερο δυνατόν.

Η υπερκατάψυξη του κιμά πρέπει, να πραγματοποιείται μόνο στους χώρους των εργαστηρίων παρασκευής ή των αυτόνομων μονάδων παραγωγής ή σε εγκεκριμένη ψυκτική αποθήκη.

Στις ψυκτικές αποθήκες ο κιμάς μπορεί να αποθηκεύεται μαζί με άλλα τρόφιμα, μόνο αν η δεύτερη συσκευασία εξασφαλίζει ότι τα τρόφιμα αυτά δεν έχουν καμία δυσμενή επίδραση.

1.1.6. Μεταφορά του κιμά

Ο κιμάς πρέπει να μεταφέρεται με τέτοιο τρόπο ώστε να προστατεύεται κατά τη μεταφορά, από παράγοντες που ενδέχεται να τον μολύνουν ή να τον αλλοιώσουν, λαμβανόμενης υπ' όψη της διάρκειας και των συνθηκών της εν λόγω μεταφοράς καθώς και τον χρησιμοποιούμενων μεταφορικών μέσων.

Ειδικότερα, τα οχήματα που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά του κιμά πρέπει να είναι εξοπλισμένα έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ότι κατά τη μεταφορά, οι θερμοκρασίες δεν υπερβαίνουν τις καθορισμένες που αναφέρθηκαν παραπάνω και να διαθέτουν καταγραφικό θερμόμετρο με το οποίο καταγράφεται η τήρηση της τελευταίας αυτής απαίτησης.

Σε περίπτωση διαμετακόμισης μέσω τρίτης χώρας και όταν το εργαστήριο παρασκευής βρίσκεται σε περιοχή υπό περιορισμό για λόγους υγειονομικού ελέγχου, το μεταφορικό μέσο πρέπει να παραμένει σφραγισμένο.

1.1.7. Υγιεινή του προσωπικού, των χώρων και του υλικού στις εγκαταστάσεις παραγωγής κιμά

Στις εγκαταστάσεις παραγωγής κιμά απαιτείται σχολαστική καθαριότητα στους χώρους και στα υλικά καθώς και εκ μέρους το προσωπικού που εργάζεται σε αυτές. **(ΦΕΚ, π.δ/μα 289/1997 (Α' 210))**.

Το προσωπικό που χειρίζεται νωπό κρέας συσκευασμένο ή μη, ή που εργάζεται σε χώρους ή ζώνες όπου γίνεται χειρισμός, συσκευασία ή μεταφορά του κρέατος αυτού, πρέπει κατ' εξοχήν να φοράει καθαρά και εύκολα καθαριζόμενα καλύμματα κεφαλής και υποδήματα, ανοιχτόχρωμα ενδύματα εργασίας και εάν χρειάζεται, καθαρά καλύμματα αυχένα ή αλλά προστατευτικά ρούχα. Το προσωπικό που ασχολείται με τη σφαγή των ζώων, την επεξεργασία ή τον χειρισμό του νωπού κρέατος πρέπει να φοράει καθαρά ενδύματα εργασίας στην αρχή κάθε ημέρας εργασίας και να τα αλλάζει όσες φορές χρειάζεται μέσα στην ημέρα, επίσης να πλένει και να απολυμαίνει τα χέρια του πολλές φορές κατά τη διάρκεια της ίδιας εργάσιμης ημέρας, καθώς και σε κάθε επανάληψη της εργασίας.

Τα άτομα τα οποία ήλθαν σε επαφή με ασθενή ζώα ή μολυσμένο κρέας οφείλουν αμέσως να πλένουν επιμελώς τα χέρια και τους βραχίονες τους με ζεστό νερό, εν συνεχεία δε να τα απολυμαίνουν. Απαγορεύεται το κάπνισμα μέσα στους χώρους εργασίας και αποθηκείωσης, στις ζώνες εκφόρτωσης, παραλαβής, διαλογής και φόρτωσης και σε όσες άλλες ζώνες και διαδρόμους γίνεται μεταφορά νωπού κρέατος.

Δεν επιτρέπεται η είσοδος ζώων στις εγκαταστάσεις. Επίσης, πρέπει να εξασφαλίζεται η συστηματική εξολόθρευση των τρωκτικών, των εντόμων και οποιουδήποτε άλλου βλαβερού ζουφίου.

Τα υλικά και τα εργαλεία τα οποία χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία του κρέατος πρέπει να συντηρούνται και να καθαρίζονται καλά, πρέπει δε να καθαρίζονται επιμελώς και να απολυμαίνονται πολλές φορές κατά τη διάρκεια της αυτής εργάσιμης ημέρας καθώς και στο τέλος των εργασιών της ημέρας και πριν από την επαναχρησιμοποίησή τους, εφόσον έχουν ρυπανθεί.

Οι χώροι, τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για τον τεμαχισμό του κρέατος και το υλικό εργασίας δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για άλλους σκοπούς.

Το κρέας και τα δοχεία που το περιέχουν δεν πρέπει να έρχονται σε άμεση επαφή με το δάπεδο.

Η χρήση του πόσιμου νερού είναι επιβεβλημένη για όλες τις λειτουργίες. Εν τούτοις, κατ' εξαίρεση, επιτρέπεται η χρήση μη πόσιμου νερού για την παραγωγή ατμού με την προϋπόθεση ότι οι αγωγοί που είναι εγκατεστημένοι για τον σκοπό αυτό δεν επιτρέπουν τη χρήση του νερού αυτού για άλλους σκοπούς και δεν παρουσιάζουν κίνδυνο μόλυνσεως του κιμά. Εξάλλου κατ' εξαίρεση, δύναται να επιτρέπεται η χρήση μη πόσιμου νερού για την ψύξη των ψυκτικών μηχανημάτων. Οι αγωγοί του μη πόσιμου νερού πρέπει να διακρίνονται ευκρινώς από τους αγωγούς του πόσιμου νερού.

Απαγορεύεται η διασκόρπιση πριονιδιού ή κάθε άλλου ανάλογου υλικού στο δάπεδο των χώρων εργασίας και αποθηκεύσεως του κιμά.

Τα απορρυπαντικά, τα απολυμαντικά και οι παρόμοιες ουσίες πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά τρόπο που να μην προσβάλλει τον εξοπλισμό, τα εργαλεία επεξεργασίας και τον κιμά. Μετά τη χρησιμοποίησή τους, ο εξοπλισμός και τα εργαλεία επεξεργασίας πρέπει να ξεπλένονται καλά με πόσιμο νερό.

Η επεξεργασία και ο χειρισμός του κρέατος πρέπει να απαγορεύεται στα άτομα τα οποία δύναται να το μολύνουν.

Κατά την πρόσληψη, κάθε πρόσωπο που ασχολείται με την εργασία και τον χειρισμό κρέατος (κιμά) οφείλει να αποδεικνύει, με ιατρικό πιστοποιητικό, ότι τίποτα δεν κωλύει την απασχόλησή του αυτή. Η ιατρική παρακολούθηση του προσώπου αυτού ρυθμίζεται από την νομοθεσία. **(ΦΕΚ, π.δ/μα 410/1994 (Α' 231)).**

Σε περίπτωση μη μηχανικής παρασκευής το προσωπικό που ασχολείται με την παραγωγή κιμά πρέπει να φέρει καλύπτρα του στόματος και της μύτης. Η Νομαρχιακού επιπέδου Κτηνιατρική Αρχή μπορεί να απαιτεί τη χρήση γαντιών είτε λείων, αδιάβροχων και μίας χρήσεως, είτε παρόμοιων που να μπορούν να καθαριστούν και να αποστειρωθούν.

1.1.8. Κριτήρια σύνθεσης και μικροβιολογικοί παράμετροι

	Περιεκτικότητα σε λίπος	Λόγος κολλαγόνου προς πρωτεΐνες κρέατος
Άπαχος κιμάς	≤7%	≤12%
Καθαρός βοδινός κιμάς	≤20%	≤15%
Κιμάς που περιέχει χοιρινό κρέας	≤30%	≤18%
Άλλα είδη	≤25%	≤15%

Πίνακας 1. Κριτήρια σύνθεσης που ελέγχονται βάση ημερήσιου μέσου όρου.

Τα εργαστήρια παρασκευής ή αυτόνομες μονάδες παραγωγής πρέπει να φροντίζουν ώστε, κατά τους ελέγχους που προβλέπονται και ανάλογα με τις μεθόδους αξιολόγησης που εκτίθενται παρακάτω, ο κιμάς να ανταποκρίνεται στα ακόλουθα κριτήρια:

Κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας:

- Αερόβια μεσόφιλα μικρόβια
- *Escherichia coli*

Κριτήρια ασφάλειας:

- *Salmonella* spp.

	M ¹	m ²
Αερόβια μεσόφιλα μικρόβια n ³ =5 c ⁴ =2	5X10 ⁶ /g	5X10 ⁵ /g
<i>Escherichia coli</i> n=5 c=2	5X10 ² /g	50/g
<i>Salmonella</i> spp. n=5 c=0	Απουσία σε 25g (ωμός κιμάς) Απουσία σε 10g (μαγειρεμένος κιμάς)	
<i>Staphylococcus aureus</i> n=5 c=2	10 ³ /g	10 ² /g

Πίνακας 2. Μικροβιολογικά Κριτήρια.

ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ:

1.M = Ανώτατο όριο αποδοχής πέρα από το οποίο τα αποτελέσματα δεν θεωρούνται πλέον ικανοποιητικά. Το **M** ισούται με το 10m όταν η καταμέτρηση πραγματοποιείται σε στερεό υπόστρωμα και με 30m όταν η καταμέτρηση πραγματοποιείται σε θρεπτικό υπόστρωμα.

2.m = Κατώτερο όριο κάτω από το οποίο όλα τα αποτελέσματα θεωρούνται ικανοποιητικά.

3. n = Αριθμός μονάδων που αποτελούν το δείγμα.

4. c = Αριθμός μονάδων του δείγματος που δίνουν τιμές μεταξύ **m** και **M**.

1.1.9. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των μικροβιολογικών αναλύσεων

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των μικροβιολογικών αναλύσεων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με:

A. Διάγραμμα τριών κατηγοριών μόλυνσης για τα αερόβια μεσόφιλα μικρόβια, το *Escherichia coli* και το *Staphylococcus aureus* δηλαδή:

- Κατηγορία κατώτερη ή ίση με το κριτήριο m,
- Κατηγορία μεταξύ του κριτηρίου m και του ανώτατου ορίου M,
- Κατηγορία που υπερβαίνει το ανώτατο όριο M.

1. Η ποιότητα της παρτίδας θεωρείται:

α) Ικανοποιητική όταν όλες οι παρατηρούμενες τιμές είναι κατώτερες με 3m εάν χρησιμοποιείται στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ή με 10m εάν χρησιμοποιείται θρεπτικό διάλυμα.

β) Αποδεκτή όταν οι παρατηρούμενες τιμές περιλαμβάνονται:

βi) μεταξύ 3m και 10m (=M) σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.

βii) 3m και 10m (=M) σε θρεπτικό διάλυμα, και όταν ο λόγος c/n είναι κατώτερος ή ίσος με δύο πέμπτα όπου $n=5c$ και $c=2$ ή οποιοδήποτε άλλο, ισοδύναμο ή ανώτερο, διάγραμμα αποτελεσματικότητας που αναγνωρίζεται από το Συμβούλιο. Τα παραρτήματα τροποποιούνται από το Συμβούλιο, που αποφασίζει με ειδική πλειοψηφία μετά από πρόταση της Επιτροπής με σκοπό, ιδίως την προσαρμογή τους στην τεχνολογική και επιστημονική τους πρόοδο.

2. Η ποιότητα της παρτίδας θεωρείται ως μη ικανοποιητική:

- Σε όλες τις περιπτώσεις που παρατηρούνται τιμές μεγαλύτερες του M.
- Όταν ο λόγος c/n είναι ανώτερος του 2,5.

Πάντως, στην περίπτωση υπέρβασης του τελευταίου αυτού ορίου για τους αερόβιους μικροοργανισμούς στους +30°C και εφόσον τηρούνται τα λοιπά κριτήρια, η υπέρβαση αυτή πρέπει να αποτελεί το αντικείμενο συμπληρωματικής ερμηνείας, ιδίως για τα ωμά προϊόντα.

Το προϊόν πρέπει οπωσδήποτε να θεωρείται τοξικό ή αλλοιωμένο όταν η μόλυνση φθάνει την οριακή μικροβιολογική τιμή S που ορίζεται γενικά σε $m \cdot 10^3$. Για το *Staphylococcus aureus*, η τιμή αυτή S δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5×10^4 . Οι ανοχές που συνδέονται με τις τεχνικές ανάλυσης δεν ισχύουν για τις τιμές των ανώτατων ορίων M και S .

B. Διάγραμμα δύο κατηγοριών μόλυνσης για το *Salmonella*, χωρίς κανένα περιθώριο ανοχής:

- «Απουσία σε »: Το αποτέλεσμα θεωρείται ικανοποιητικό.
- «Παρουσία σε»: Το αποτέλεσμα θεωρείται μη ικανοποιητικό.

(ΦΕΚ, π.δ/μα 289/1997 (Α' 210)).

1.2. Η επιθεώρηση του κιμά

Η επιθεώρηση του κιμά περιλαμβάνει:

- A.** Τον υγειονομικό έλεγχο
- B.** Τον χημικό έλεγχο και
- Γ.** Τον έλεγχο προελεύσεως του κιμά.

A. Ο υγειονομικός έλεγχος περιλαμβάνει:

- 1.** Τον μακροσκοπικό έλεγχο.
- 2.** Τον ιστολογικό έλεγχο.
- 3.** Τον ιστομετρικό έλεγχο και
- 4.** Τον βακτηριολογικό έλεγχο.

A.1. Ο μακροσκοπικός έλεγχος γίνεται εξετάζοντας τα παρακάτω:

- Το χρώμα
- Τη σύσταση και
- Την οσμή του νωπού κιμά.

A.2. Ο ιστολογικός έλεγχος, αποσκοπεί στην ανακάλυψη εντός του κιμά άλλων ιστών και οργάνων του σφαγίου, των οποίων απαγορεύεται η προσθήκη ως στομάχων, μήτρας, πνευμόνων και ήπατος.

A.3. Ο ιστομετρικός έλεγχος, αποσκοπεί στην εκτίμηση της αναλογίας κάθε είδους επί τοις εκατό (%).

A.4. Ο βακτηριολογικός έλεγχος, δεν είναι πάντοτε αναγκαίος και γίνεται όταν ο μακροσκοπικός έλεγχος αποδεικνύει κάποια ανωμαλία ή όταν από την κατανάλωση τέτοιων προϊόντων προέκυψαν ανωμαλίες στην υγεία των καταναλωτών. Ο έλεγχος αυτός προσφέρει αδιάσειστα τεκμήρια για την καταλληλότητα ή όχι του κιμά από πλευράς βακτηρίων και τοξινών.

Στον κιμά οι βακτηριακές μολύνσεις έχουν δύο προελεύσεις:

1. Εκείνες οι οποίες προϋπάρχουν εντός του κρέατος κατά την μετατροπή του σε κιμά, και οι οποίες διακρίνονται σε:

1.α. Ενδογενείς βακτηριακές μολύνσεις, οι οποίες προέρχονται από βακτήρια τα οποία προϋπήρχαν μέσα στο κρέας πριν από τη σφαγή του ζώου.

1.β. Εξωγενείς βακτηριακές μολύνσεις, οι οποίες προέρχονται από τη στιγμή της σφαγής του ζώου μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας του κρέατος.

Οι τελευταίες μολύνσεις είναι πλέον εκτεταμένες στα κρέατα τα οποία μεταφέρονται από άλλες πόλεις ή χώρες ώστε να μετατραπούν σε κιμά και όσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση τόσο μεγαλύτερη είναι η μόλυνση.

2. Εκείνες οι οποίες συμβαίνουν κατά ή μετά τη συγκοπή του κρέατος. Αυτές οι μολύνσεις είναι συχνότερες στα προϊόντα τα οποία υφίστανται πολλαπλό χειρισμό και μακροχρόνια κατεργασία και προέρχονται από τα χέρια των εργατών, από τα ενδύματά τους, από την προσθήκη των διαφόρων αρτυμάτων και άλλων πρόσθετων ουσιών.

Επίσης, πρέπει να επικρατεί απόλυτη καθαριότητα τόσο των χεριών και των ενδυμάτων όσο και των κρεατομηχανών και των δοχείων των εργοστασίων. Τέλος, οι πρόσθετες ύλες να μεταφέρουν όσο το δυνατό μικρότερο μικροβιολογικό φορτίο (βακτήρια).

Η βακτηριολογική εξέταση γίνεται με ενοφθαλμισμό, ορισμένης ποσότητας υλικού σε ειδικά θρεπτικά υποστρώματα κατόπιν αραίωσης της μέσα σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό ή πεπτονούχου ύδατος, σε αναλογία 11 g κιμά και 99 ml υγρού. Είναι δυνατό να γίνει και μικροσκοπικό παρασκεύασμα απ' ευθείας από το διάλυμα, το οποίο μας πληροφορεί για την έκταση της μόλυνσης. Αν απλωθεί 0,01

ml αυτού πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, τότε ένα βακτήριο κατά οπτικό πεδίο αντιστοιχεί σε 5.000.000 βακτήρια κατά 9 g δείγματος. Πραγματοποιείται εξέταση πολλών οπτικών πεδίων και λαμβάνεται ο μέσος όρος.

Γενικά, ο ωμός κιμάς περιέχει μεγάλο αριθμό βακτηρίων, διότι προέρχεται από μικρά τεμάχια (trimmings) κρέατος, τα οποία έχουν μεγάλη επιφάνεια, φιλοξενούν και ευνοούν την ανάπτυξη περισσότερων αερόβιων βακτηρίων. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι είναι ακατάλληλος προς κατανάλωση εκείνη τη στιγμή. Σημαίνει όμως, ότι η συντήρησή του είναι δύσκολη και θα πρέπει να μετατρέπεται σε κρεατοσκευάσματα το γρηγορότερο δυνατόν ή να λαμβάνονται ειδικές φροντίδες για την αποφυγή της αλλοίωσής του.

Για τον περιορισμό της μόλυνσης και της ανάπτυξης βακτηρίων στον κιμά απαιτείται καλή βακτηριολογική πρώτη ύλη και καθαρή προετοιμασία και συντήρησή του. Πολλές φορές, προστίθεται μαγειρικό άλας και οργανικά οξέα για τον υποβιβασμό του pH., αλλά ο καλύτερος τρόπος είναι η ψύξη και η έγκαιρη χρησιμοποίηση του.

B. Ο χημικός έλεγχος, αποσκοπεί στην ανίχνευση μη επιτρεπόμενων ουσιών.

Οι κυριότερες νοθείες του κιμά είναι:

- Η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας νερού.
- Η προσθήκη σακχάρων, άλατος ή αμύλου.
- Η προσθήκη χρωστικών ουσιών.
- Η προσθήκη λίπους και άλλων ουσιών κατώτερης θρεπτικής αξίας ή αντισηπτικών ή αντιοξειδωτικών. **(Πανέτσος 1978).**

Γ. Ο έλεγχος προέλευσης του κιμά, πρόκειται για έλεγχο των κρεάτων από τα οποία προέρχεται ο κιμάς.

1.2.1. Οι έλεγχοι του κιμά

Τα εργαστήρια παρασκευής κιμά υπόκεινται σε έλεγχο της Νομαρχιακού επιπέδου Κτηνιατρικής Αρχής, η οποία πρέπει να εξασφαλίζει ότι τηρούνται κάποιες συγκεκριμένες απαιτήσεις. Συγκεκριμένα ελέγχει:

- Την καθαριότητα των χώρων, των εγκαταστάσεων, των εργαλείων και της υγιεινής του προσωπικού.

- Την αποτελεσματικότητα των ελέγχων που διενεργούνται από την εγκατάσταση, ιδίως εξετάζοντας τα πορίσματα και διενεργώντας δειγματοληψία.
- Την μικροβιολογική και υγειονομική ποιότητα του κιμά.
- Την κατάλληλη σήμανση καταλληλότητας του κιμά.
- Τις συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς.

Επίσης, η Νομαρχιακού επιπέδου Κτηνιατρική Αρχή, διενεργεί, στο πλαίσιο των επίσημων ελέγχων, κάθε αναγκαία δειγματοληψία για τις εργαστηριακές εξετάσεις με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του αυτοελέγχου.

Ακόμη φροντίζει να προβαίνει σε οποιοδήποτε άλλο έλεγχο κρίνει αναγκαίο για την εξασφάλιση της τήρησης των απαιτήσεων των προεδρικών διαταγμάτων. Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών ελέγχων πρέπει να αξιολογούνται από την Νομαρχιακού επιπέδου Κτηνιατρική Αρχή βάσει των κριτηρίων σύνθεσης του κιμά, καθώς και των μικροβιολογικών παραμέτρων που αφορούν τον κιμά.

Η Νομαρχιακού επιπέδου Κτηνιατρική Αρχή πρέπει, ανά πάσα στιγμή, να έχει ελεύθερη πρόσβαση στις ψυκτικές αποθήκες και σε όλους τους χώρους εργασίας για να ελέγχει την αυστηρή τήρηση των διατάξεων αυτών. **(ΦΕΚ, π.δ/μα 289/1997 (Α' 210))**.

1.2.2. Έλεγχος του κιμά από τον καταναλωτή

Ο κιμάς όπως άλλωστε όλα τα ζωικά τρόφιμα, ελέγχεται μακροσκοπικά (εξέταση οσμής, χρώματος, γεύσης) και εργαστηριακά από ειδικούς κτηνιάτρους.

Τη μακροσκοπική εξέταση μπορεί να την κάνει ο κάθε καταναλωτής, έχοντας υπόψη του ότι η οσμή του κιμά πρέπει να είναι ευχάριστη (οσμή νωπού κρέατος) και το χρώμα του καθαρό στην απόχρωση του ερυθρού, χωρίς εστίες διαφορετικού χρώματος. Όταν η οσμή ξεφύγει από το φυσιολογικό και μας φαίνεται ασυνήθιστη δεν πρέπει να το διακινδυνεύσουμε, αλλά είναι προτιμότερο ο κιμάς να πετιέται. Στην περίπτωση αυτή ο μικροβιολογικός έλεγχος είναι περιττός. Όπου υπάρχουν αμφιβολίες, ο καταναλωτής μπορεί να ζητά τη γνώμη του κτηνιάτρου επιθεωρητή τροφίμων.

1.2.3. Κατεψυγμένος κιμάς στο σπίτι

Με τον όρο “κατεψυγμένος κιμάς” εννοούμε:

- Τον κιμά που μας κόβει ο πωλητής από κατεψυγμένο βοδινό κρέας και
- Τον κιμά που προήλθε από νωπό κρέας ή από κατεψυγμένο κρέας και στη συνέχεια καταψύχθηκε.

Στην πρώτη περίπτωση, ο κιμάς δεν θα πρέπει να ξαναμπαίνει στη κατάψυξη του σπιτιού μας, αλλά να μαγειρεύεται την ίδια μέρα, γιατί η αλλοίωση του και η υποβάθμισή του είναι πιο γρήγορη από το νωπό κρέας.

Στην δεύτερη περίπτωση, ο συσκευασμένος κατεψυγμένος κιμάς, εφόσον θέλουμε να τον κρατήσουμε περισσότερες ημέρες, πρέπει να τοποθετείται στο θάλαμο κατάψυξης του ψυγείου μας. Η διάρκεια συντήρησής του να μην ξεπερνά την ημερομηνία που αναγράφεται στη συσκευασία. Όταν θελήσουμε να τον μαγειρέψουμε τον κατεβάζουμε (από πριν) στην απλή ψύξη (3°-4°C) ώστε να αποψυχθεί σιγά-σιγά.

Η συντήρηση των κατεψυγμένων τροφίμων γενικά στο σπιτικό ψυγείο, περιορίζει το χρόνο συντήρησης που προβλέπει ο νόμος για τα επαγγελματικά ψυγεία.

Ο κατεψυγμένος κιμάς είναι πολύ διαδεδομένος αλλά αντιμετωπίζεται με κάποια δυσπιστία, επειδή ο αγοραστής τον προμηθεύεται έτοιμο, συσκευασμένο, αντίθετα με τον νωπό που μπορεί να επιλέξει το κομμάτι κρέατος της προτίμησής του.

Τέλος, ο κατεψυγμένος κιμάς έναντι του κατεψυγμένου κρέατος παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως:

- Μπορούν να πωληθούν εύκολα κομμάτια που δεν θα μπορούσαν να δοθούν στο εμπόριο ως έχουν.
- Είναι δυνατή η εκμετάλλευση των υπολειμμάτων που προκύπτουν από την αποστέωση όταν επεξεργάζεται το κρέας.
- Καταναλώνεται το κρέας γερασμένων ζώων που δεν μπορεί να μαγειρευτεί αυτούσιο λόγω της σκληρότητας.

Τρώγεται εύκολα από παιδιά και ηλικιωμένους που έχουν προβλήματα στη μάσηση.

1.2.4. Συσκευασμένος κιμάς στα καταστήματα

Ο νόμος επιτρέπει την κοπή και συσκευασία κιμά σε ειδικά εργαστήρια όπου η κτηνιατρική υπηρεσία ελέγχει το κρέας που προορίζεται για τον σκοπό αυτό, τις συνθήκες παρασκευής αλλά και αυτόν τον έτοιμο κιμά.

Στη συσκευασμένη αυτή μορφή του ναπού κιμά, σύμφωνα με τον νόμο, πρέπει να αναγράφονται στη συσκευασία:

- Το ονοματεπώνυμο της επιχείρησης.
- Η λέξη «ΚΙΜΑΣ».
- Το είδος του ζώου και η κατηγορία του κρέατος.
- Η ημερομηνία μέχρι την οποία μπορεί να καταναλωθεί, που δεν μπορεί να είναι πάνω από τρεις ημέρες από την συσκευασία του.
- Ο αριθμός άδειας ή ο κωδικός αριθμός εργαστηρίου παρασκευής του.

Ο συσκευασμένος κιμάς δεν επιτρέπεται να περιέχει τίποτα άλλο εκτός από λίπος μέχρι 20% και αλάτι σε αναλογία 15g/κιλό κιμά. **(Τρόφιμα και καταναλωτής – Οδηγός Αγοράς & Υγιεινής Συντήρησης Των Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, 1998).**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

2.1. Τροφικές δηλητηριάσεις

Τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (κρέας, γάλα, αυγά κλπ) είναι τα πιο κατάλληλα για την ανάπτυξη των μικροβίων. Από τα μικρόβια, άλλα προκαλούν οργανοληπτικές αλλοιώσεις στα τρόφιμα, δηλ. αλλάζουν το χρώμα, τη γεύση, την οσμή και τη σύστασή τους, οπότε είναι εύκολο να το αντιληφθούμε, ενώ τα άλλα δεν προκαλούν καμία αλλαγή και αυτά είναι τα πιο επικίνδυνα.

Μια μόλυνση, δεν είναι αρκετή για να καταστήσει ένα τρόφιμο επικίνδυνο για δηλητηρίαση. Για να γίνει αυτό, πρέπει να βοηθήσουν και άλλοι παράγοντες όπως:

- Ο αριθμός μικροβίων να είναι αρκετά μεγάλος.
- Το ίδιο το τρόφιμο να ευνοεί τον πολλαπλασιασμό τους.
- Η θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου να είναι μεταξύ 20-35°C.
- Ο ατελής βρασμός που είναι ο χειρότερος από τον καθόλου βρασμό.
- Ο χρόνος συντήρησης του τροφίμου να είναι αρκετός.

Το πρόβλημα των ανθρώπινων σαλμονελώσεων οφείλεται στη συνεργική δράση πολλών παραγόντων, οι οποίοι διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς. Οι ενδογενείς παράγοντες σχετίζονται με τη μικροβιολογική ποιότητα των τροφίμων και τις συνθήκες προετοιμασίας, ενώ οι εξωγενείς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, ενισχύουν τη δράση των εσωτερικών παραγόντων. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες μπορούν να ελεγχθούν αποτελεσματικά με προληπτικές ενέργειες, όπως προγράμματα για τον περιορισμό των επιμολύνσεων των ζώων και των πουλερικών και προγράμματα για την εκπαίδευση των καταναλωτών στον ασφαλή χειρισμό των τροφίμων. Οι επιμολύνσεις με *Salmonella* εξαπλώνονται γρήγορα σε ζώα και πουλερικά που σιτίζονται με μολυσμένες ζωοτροφές και ιδιαίτερα σε μονάδες που εφαρμόζουν μεθόδους εντατικής εκτροφής. Η υποχρεωτική νηστεία σε συνάρτηση με το άγχος στην οποία υπόκεινται τα ζώα κατά τη διάρκεια μεταφοράς στα σφαγεία ενισχύουν τα προβλήματα επιμολύνσεων με *Salmonella*. Ο προσδιορισμός των κύριων αιτιών μόλυνσης των κρεάτων και των πουλερικών αποτέλεσε τη βάση για την καθιέρωση μέτρων ελέγχου των επιμολύνσεων. Η

εκτροφή πουλερικών απαλλαγμένων από επιμολύνσεις σε πτηνοτροφεία της Μ. Βρετανίας οδήγησε σε αξιοσημείωτη μείωση της εξάπλωσης των μολύνσεων με *Salmonella enteritidis* πουλερικών.

Στη Σκανδιναβία, η εφαρμογή αυστηρών μέτρων υγιεινής στα πτηνοτροφεία περιόρισε σημαντικά τους ρυθμούς μεταφοράς του *Campylobacter jejuni* από το εξωτερικό περιβάλλον στα κοτόπουλα.

Για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των μέτρων υγιεινής και του συστήματος HACCP στην εξάλειψη της *Salmonella* από τα κρέατα και τα πουλερικά εφαρμόζονται ανοσολογικές μέθοδοι, οι οποίες προτιμώνται για την ταχύτητα, αξιοπιστία, εύκολη χρήση και το χαμηλό κόστος τους. Ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πρωτόκολλα είναι το σάντουιτς ευρύτερα γνωστό ως ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Ένα άλλο παθογόνο το οποίο έχει θεωρηθεί υπεύθυνο για την πρόκληση τροφικών δηλητηριάσεων από την κατανάλωση πουλερικών είναι το *Campylobacter*. Περιορισμένης έκτασης επιμόλυνση σφαγίων με *Campylobacter jejuni* και *coli* αρκεί για να μετατρέψει σε επικίνδυνους φορείς μετάδοσης των μικροοργανισμών στους χώρους επεξεργασίας. Οι τροφικές δηλητηριάσεις συνήθως παρατηρούνται κατά τη διάρκεια επεξεργασίας νωπών πουλερικών και οφείλονται σε επιμολύνσεις από άλλα τρόφιμα ή σε άμεση μεταφορά του παθογόνου στο στόμα. Η ψύξη των σφαγίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα αποτελεσματικό μέσο περιορισμού των επιμολύνσεων από το *Campylobacter*, χωρίς όμως να το εξαλείφει από τα μολυσμένα τρόφιμα. Η *Yersinia enterocolitica* είναι επίσης ένα από τα παθογόνα που σχετίζονται με τρόφιμα ζωικής προέλευσης και μεταδίδεται μέσω της πεπτικής οδού, των αμυγδαλών και των γλωσσών κατά τη διάρκεια της σφαγής και επεξεργασίας.

Η μικροχλωρίδα στην επιφάνεια νωπών σφαγίων που διαμορφώνεται από το περιβάλλον των χώρων επεξεργασίας αποτελείται από τα *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* και *Citrobacter freundii*. Το *Aeromonas hydrophila* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης του επιπέδου υγιεινής που επιτυγχάνεται στον εξοπλισμό επεξεργασίας ενώ η *Listeria monocytogenes* ως δείκτης της συνολικής κατάστασης υγιεινής που επικρατεί στα σφαγεία. Ο *Staphylococcus aureus* συναντιέται τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους και αποτελεί σημαντικό παράγοντα τροφοτοξινώσεων. Αν και θεωρείται σχετικά αδύναμος ανταγωνιστής των υπόλοιπων παθογόνων, μεταδίδεται εύκολα από τα χέρια των εργαζόμενων, τον

εξοπλισμό και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η παραγωγή εντεροτοξινών προϋποθέτει την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus*, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της υγιεινής που επικρατεί στους χώρους επεξεργασίας. Στη Μ. Βρετανία, συνηθισμένη αιτία τροφικών δηλητηριάσεων αποτελεί η επιβίωση, η θερμική ενεργοποίηση και η εκβλάστηση των σπορίων του *Clostridium perfringens* κατά την προετοιμασία, θερμική επεξεργασία και ψύξη μεγάλων ποσοτήτων κρεατοσκευασμάτων.

Ένα σημαντικό μέρος του συστήματος HACCP για τον περιορισμό των τροφικών δηλητηριάσεων που προκαλούνται από τρόφιμα κρέατα και πουλερικά επικεντρώνεται στην καθιέρωση των εμβολιασμών των ζώων και στον ανταγωνιστικό αποκλεισμό των παθογόνων. Μια καινοτομία στον τομέα αυτό είναι η εφαρμογή της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA για την παραγωγή εμβολίων. Η μεθοδολογία DNA/RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ενός είδους ή μιας κατηγορίας μικροοργανισμών αξιοποιώντας την ιδιαιτερότητα των κωδικοποιημένων αλληλουχιών των χρωμοσωμάτων ή των πλασμιδίων DNA/RNA. Έχουν ήδη δημιουργηθεί πρότυπα για την ανίχνευση του γένους της εντεροτοξίνης του *Staphylococcus aureus* και του γένους της αιμολυσίνης του *Listeria monocytogenes*. Η μέθοδος αυτή αναμένεται να αποτελέσει ένα αξιόπιστο σύστημα ελέγχου των CCPs στις βιομηχανίες τροφίμων εφόσον απλοποιηθεί και γίνει περισσότερο εύχρηστη.

Για την αξιολόγηση της μικροβιολογικής ασφάλειας κατά τη διάρκεια παραγωγής και της διατήρησης της ποιότητας των τροφίμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι δείκτες. Στα νωπά κρέατα υπάρχει μεγάλος αριθμός μεταβολιτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες σφαλμάτων κατά την επεξεργασία, όπως το γαλακτικό οξύ, τα αμινοξέα, οι αμίνες, το οξικό οξύ και η αμμωνία. Η μέτρηση των ψυχρόφιλων βακτηρίων στα σφάγια αποσκοπεί στη βελτίωση των μετρήσεων που αποσκοπούν στην αποτίμηση της υγιεινής κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Οι δείκτες που στηρίζονται στη μέτρηση της θερμοκρασίας είναι ιδιαίτερα εύχρηστοι και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό πιθανής ανάπτυξης της *Salmonella* ή της *E. coli*.

Η έκθεση των κρεάτων σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολιών ιονισμού μπορεί να αποτελέσει μια οικονομική και ασφαλή μέθοδο περιορισμού ή εξάλειψης των εντερικών παθογόνων από τα κρέατα και τα πουλερικά. Ανθεκτικά στην ακτινοβολία ιονισμού είναι τα ενδοσπόρια του *Clostridium perfringens* και του *Bacillus*, οι εντεροτοξίνες του *Staphylococcus* και οι αφλατοξίνες. Η ρύθμιση της θερμοκρασίας

αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της ακτινοβόλησης, γιατί οι χαμηλές θερμοκρασίες, αν και προκαλούν μικρότερες οργανοληπτικές μεταβολές στα κρέατα και τα πουλερικά, απαιτούν μεγαλύτερες δόσεις ακτινοβολίας για να είναι αποτελεσματικές.

Κατηγορίες τροφοδηλητηριάσεων:

Ανάλογα με τη φύση του παθογόνου αιτίου, χωρίζουμε τις τροφοδηλητηριάσεις σε δυο κατηγορίες:

- 1) Τις **τροφολοιμώξεις**, όταν το αίτιο είναι τα ίδια τα ζωντανά μικρόβια, και
- 2) Τις **τροφοτοξινώσεις**, όταν το αίτιο είναι οι τοξίνες των ίων που έχουν δημιουργηθεί στα τρόφιμα πριν ακόμη αυτά καταναλωθούν.

Οι τροφολοιμώξεις απαιτούν μεγαλύτερο χρόνο, που ανάλογα με το είδος των μικροβίων κυμαίνεται μεταξύ 12 ωρών και μερικών ημερών, ενώ οι τροφοτοξινώσεις, εκδηλώνονται μέσα σε λίγες ώρες γιατί οι έτοιμες τοξίνες των μικροβίων ενεργούν σαν χημικά δηλητήρια. (Ελευθεριάδου 2008).

2.2. Βιολογικοί κίνδυνοι στον κιμά

2.2.1. Παθογόνοι μικροοργανισμοί στον κιμά και οι επιπτώσεις αυτών στην ανθρώπινη υγεία

Ο κιμάς υπόκειται πολύ εύκολα σε επιμολύνσεις, γι' αυτό έχει και πολύ μικρή διάρκεια συντήρησης (2-3 ημέρες στην απλή ψύξη). Γενικά, θεωρείται ότι φέρει μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο, σε σύγκριση με τα αυτοτελή τεμάχια κρέατος από τα οποία προέρχεται για τους παρακάτω λόγους:

- Κατά τη διαδικασία της αποστέωσης, του τεμαχισμού του κρέατος και της παρασκευής του κιμά, οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στην επιφάνεια του κρέατος διασπείρονται σε όλη τη μάζα του που αποτελεί άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξή τους. (Mossel et al. 1995, ICMSF 1998, Doyle et al. 2001).
- Οι χειριστές και τα μηχανήματα κοπής του κιμά αποτελούν σημαντικές πηγές μόλυνσης του προϊόντος. (ICMSF 1998, Jay 2005).
- Λόγω του λεπτού τεμαχισμού που υφίσταται ο κιμάς, εξέρχεται μυϊκός οπός, ο οποίος αποτελεί άριστο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και παράλληλα αυξάνεται η επιφάνεια του, η οποία ευνοεί

την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί συμβάλλουν στην αλλοίωση του προϊόντος σε χαμηλές θερμοκρασίες. **(ICMSF 1998, Jay 2005, Doyle et al. 2001, Ray 2004).** (ΕΚ αριθμ. 2073/2005).

Η μικροβιολογική χλωρίδα του κιμά αποτελείται κυρίως από βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Micrococcus* και *Pseudomonas* καθώς και σε αντιπροσώπους της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. **(ICMSF 1998, Doyle et al. 2001, Jay et al. 2005).**

Τα είδη του γένους *Pseudomonas*, αποτελούν τους βασικότερους μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοίωση στην επιφάνεια του κιμά ενώ στο εσωτερικό επικρατούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια και η *Broc. thermosphacta*. **(ICMSF 1998, Jay et al. 2005).**

Στοιχεία από διάφορες χώρες δείχνουν ότι δείγματα κιμά ήταν θετικά για *Salmonella* spp. σε ποσότητα από 1 έως 20%. **(Roberts et al. 1980, USDA 1996, Gashe & Mpuchane 2000, Heredia et al. 2001, Maaden & Stolle 2005).** Επίσης, σε σχετικά χαμηλό ποσοστό δειγμάτων μπορεί να ανιχνευτούν η *Yersinia enterocolitica* και η *Escherichia coli* 0157: H7 **(ICMSF 1998).**

Όσον αφορά τα βακτήρια που μπορούν να προκαλέσουν τροφικές δηλητηριάσεις ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το *Clostridium perfringens*, επειδή έχει διαπιστωθεί ότι οι σπόροι του μπορούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασίες μαγειρέματος και στη συνέχεια να ενεργοποιηθούν σε ορισμένες κατηγορίες τροφίμων. Η συχνότητα του *Clostridium perfringens* σε δείγματα κιμά και νωπών αλλαντικών ήταν μεταξύ 47 και 81%. **(Ali & Fung 1991).** Συνεπώς, απαντάται σε πληθυσμό που κυμαίνεται μεταξύ <50/g και 1000/g. **(ICMSF 1998).**

Επίσης, ο *Staphylococcus aureus* συχνά απομονώνεται από κιμάδες. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στις Η.Π.Α. έδειξε ότι η συχνότητα του *Clostridium perfringens* και του *Staphylococcus aureus* σε 563 δείγματα βοείου κιμά ήταν 53% και 30% αντίστοιχα. **(ICMSF 1996).**

Άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί που μπορεί να απαντώνται στον κιμά είναι η *Listeria monocytogenes* σε κιμά, σύμφωνα με διεθνή στοιχεία ποικίλει από 12 έως 92%. **(Ferber & Peterkin 1991, USDA 1996, Heredia et al. 2001).** (ΕΚ αριθμ. 2073/2005).

Στη χώρα μας η νομοθεσία που αφορά τον μικροβιολογικό έλεγχο του κιμά καλύπτεται από τον «Κανονισμό (ΕΚ) αριθμ. 2079/2005 της Επιτροπής της 15^{ης}

Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα». Σύμφωνα με τον Κανονισμό αυτό τα μικροβιολογικά κριτήρια που αφορούν τον κιμά διακρίνονται σε «κριτήρια ασφάλειας» και «κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας». **(ΕΚ αριθ. 2073/2005).**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ESCHERICHIA COLI

3.1. Γενικά-Ιδιότητες

Το είδος *Escherichia coli*, Ανήκει στην οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών και στο γένος *Escherichia*. Το γένος *Escherichia* παλαιότερα υποδιαιρούταν σ' ένα αριθμό από είδη, με διαφορές στις αντιδράσεις της ζύμωσης της γλυκόζης, όμως σήμερα μόνο ένα είδος της *E.coli*, είναι αναγνωρίσιμο και αυτό υποδιαιρείται σε ορότυπους και βιότυπους. Η *Escherichia coli* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1885 από τον Theobald Escherich, από κόπρανα παιδιού. Τα χαρακτηριστικά της *Escherichia* διακρίνονται από άλλα εντεροβακτηριοειδή, όταν αυτά είναι σε κίνηση, με παραγωγή αερίου, ζυμώνουν τη γλυκόζη, τη λακτόζη και παράγουν ινδόλη.



3.1.1. Μορφολογία

Είναι ευθέα χοντρά βακτηρίδια με αποστρογγυλωμένα άκρα. Το μήκος τους κυμαίνεται, συνήθως, από 2-3μm. Όταν οι συνθήκες είναι δυσμενείς (υπόστρωμα που περιέχει πενικιλίνη), σχηματίζουν μακριές νηματοειδείς μορφές. Ορισμένα στελέχη περιβάλλονται από κάψα (έλυτρο), που αποτελείται από βλενοπολυσακχαρίτες (mycopolysacchariden), στις οποίες οφείλεται η βλενώδης όψη των αποικιών της *E.coli*. Τα περισσότερα βακτηριδιακά στελέχη διαθέτουν περίτριχες βλεφαρίδες και είναι κινητά. Πολλά μικροβιακά κύτταρα είναι εξοπλισμένα με ειδικά ινίδια F (Fimbriae), που αποκαλούνται συζευκτικά ινίδια (sex fimbriae ή sex pili) και τα οποία επιτελούν τη σύζευξη ανάμεσα στα F⁺ και F⁻ μικροβιακά κύτταρα. Ο αριθμός των συζευκτικών ινιδίων κάθε κυττάρου είναι μικρός. Τα ινίδια αυτά φέρουν αυλό μέσω του οποίου κατά τη σύζευξη μεταφέρεται γενετικό υλικό. **(Κουμπατή-Αρτοποιού, Σαρρής, Ηλιάδης, Μπουρτζή-Χατζοπούλου 1986).**

3.1.2. Κατανομή στη φύση

Η *E.coli* έχει παγκόσμια εξάπλωση. Βρίσκεται φυσιολογικά στο έντερο του ανθρώπου και των ζώων, απ' όπου αποβάλλεται με τα κόπρανα, διασπείρεται στο περιβάλλον (έδαφος, νερά, φυτά, αέρα κ.α.) και μολύνει τα τρόφιμα. Η *E.coli* αποτελεί δείκτη της υγιεινής κατάστασης του νερού και των τροφίμων. Η απομόνωση της σε μεγάλο αριθμό από δείγματα π.χ. νερού, υποδηλώνει, ότι στο νερό καταλήγουν κοπρανώδη υπολείμματα, που έχουν ως αποτέλεσμα την πιθανή μόλυνση αυτού και με σαλμονέλες, γεγονός το οποίο αποτελεί σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. (Μαζαράκη 2008).

3.1.3. Ανθεκτικότητα

Τα περισσότερα στελέχη της *E.coli* καταστρέφονται σε 15 min.στη θερμοκρασία των 60°C. Στα συνήθη απολυμαντικά παρουσιάζουν ευαισθησία. Σε ξηρή κατάσταση αυξάνεται η αντοχή τους και διατηρούνται για μήνες. Εξαιτίας της αλόγιστης χρήσης των αντιβιοτικών και των χημειοθεραπευτικών στην πρόληψη και τη θεραπεία, τα περισσότερα παθογόνα στελέχη της *E.coli* απέκτησαν αντοχή στις διάφορες θεραπευτικές ουσίες.

3.1.4. Καλλιεργητικά χαρακτηριστικά

Η *E.coli* αναπτύσσεται καλά σε κοινά θρεπτικά υποστρώματα. Οι αποικίες της σε κοινό άγαρ είναι αδιαφανείς, λευκόφαιες και μεγαλύτερες από τις αποικίες των σαλμονέλων. Πολλά στελέχη στο αιματούχο άγαρ προκαλούν αιμόλυση.

3.1.5. Αντιγόνα

Τα αντιγόνα της *E.coli* είναι συστατικά του κυττάρου και διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

- Στα σωματικά αντιγόνα (αντιγόνα O)
- Στα βλεφαριδικά αντιγόνα (αντιγόνα H) και
- Στα αντιγόνα της κάψας (αντιγόνα K)

Εκτός από τα παραπάνω αντιγόνα, ορισμένα βακτηρίδια διαθέτουν ακόμη:

- Τα αντιγόνα της βλέννας (αντιγόνα M) και
- Τα αντιγόνα των ινιδίων (αντιγόνα F)

Τα ακίνητα βακτηρίδια δεν διαθέτουν βλεφαρίδες και για το λόγο αυτό στερούνται τα βλεφαριδικά αντιγόνα Η.

Μέχρι σήμερα είναι γνωστά περισσότερα από 160 αντιγόνα Ο, 91 αντιγόνα Κ και 49 αντιγόνα Η. Έρευνες σε εντεροπαθογόνα *E.coli* που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο, τα μηρυκαστικά και τους χοίρους, αποκάλυψαν αντιγόνα, που ονομάστηκαν παράγοντες αποικισμού, ή παράγοντες προσκόλλησης. Ακόμη αποδείχτηκε, ότι υπεύθυνα για την προσκόλληση των βακτηριδίων στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου είναι ορισμένα είδη ινιδίων, που αποτελούν προεκβολές του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία ονομάστηκαν:

- i. K99 ινίδια (K99 pili), τα αντιγόνα των παθογόνων, στα μηρυκαστικά, βακτηριδιακών κυττάρων και
- ii. K88 ινίδια και 987P ινίδια ή Iowa ινίδια, τα αντιγόνα των παθογόνων, στο χοίρο, βακτηριδίων της *E.coli*.

3.1.6. Τοξίνες

Οι ενδοτοξίνες των *E.coli* είναι λιποπολυσακχαρίτες, που προέρχονται από το τοίχωμα του βακτηριδιακού κυττάρου και ελευθερώνονται, συνήθως, με τη λύση του. Είναι θερμοάντοχες και έχουν μοριακό βάρος 100000 Daltons.

3.1.7. Εντεροτοξίνες

Είναι κοινά αποδεκτό, ότι τα εντεροπαθογόνα στελέχη της *E.coli* παράγουν εντεροτοξίνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως εξωτοξίνες. Γνωστές είναι:

1. Η θερμοευαίσθητη τοξίνη (LT), που είναι ουσία πρωτεϊνικής φύσεως, με μοριακό βάρος 102000 Daltons και με αντιγονικές ιδιότητες. Η ανίχνευσή της γίνεται κυρίως με τη δοκιμή της περιίδεσης του εντέρου (Darmligaturtest), σε χοιρίδια ή σε κουνέλια, καθώς και με κυτταρικές δοκιμές.
2. Η θερμοάντοχη τοξίνη (ST), που είναι ουσία πολυπεπτιδικής φύσεως με μοριακό βάρος 1000-10000 Daltons και που αντιγονικές της ιδιότητες δεν αποδείχτηκαν μέχρι σήμερα. Η ανίχνευσή της γίνεται κυρίως με τη δοκιμή σε νεογέννητα ποντίκια 3-4 ημερών, καθώς και με τη δοκιμή της περιίδεσης του εντέρου.

Στο πίνακα 3 παρουσιάζεται επιγραμματικά επιδημίες που προκλήθηκαν παγκοσμίως λόγω της κατανάλωσης τροφίμων και νερού, στα οποία απομονώθηκαν στελέχη *E. coli* που παράγουν ST-τοξίνη.

Έτος	Είδος τροφίμου	Περιστατικά/θάνατοι	Τοποθεσία
1982	Χάμπουργκερ	21/0	Μίσιγκαν
1985	Κρύα σάντουιτς	73/19	Οντάριο, Καναδάς
1985	Νωπές πατάτες	24/0	Ηνωμένο Βασίλειο
1986	Νωπό γάλα	46/0	Οντάριο, Καναδάς
1987	Ρολό γαλοπούλας	26/0	Ηνωμένο Βασίλειο
1989	Νερό	243/4	Καμπούλ
1992	Άγνωστο	9/1	Ιταλία
1994	Σαλάμι	23/0	Ουάσιγκτον, Καλιφόρνια
1995	Βρασμένα λουκάνικα	23/1	Ν. Αυστραλία

Πίνακας 3.

3.1.8. Παθογόνος δράση

Είναι ευκαιριακά παθογόνα και προκαλούν στα διάφορα όργανα του ανθρώπου και των ζώων φλεγμονές, διαπυήσεις, μαστίτιδες, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, αρθρίτιδες κ.α. Σε νεογέννητα και σε νεαρά άτομα προκαλούν ακόμη εντερίτιδες και σηψαιμίες. Απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόκληση διάρροιας είναι ο πολλαπλασιασμός της παθογόνου *E.coli* στο λεπτό έντερο, όπου φυσιολογικά υπάρχει σε πολύ περιορισμένο αριθμό. Η απότομη αύξηση του αριθμού των εντεροπαθογόνων *E.coli* στο λεπτό έντερο, αποδίδεται σε διάφορες αιτίες, όπως είναι οι πεπτικές διαταραχές, που απολήγουν σε δυσπεψία, η ανεπαρκής ανοσία στα κολοβακτηρίδια κ.α.

Σχετικές έρευνες έδειξαν, ότι τα αντιγόνα προσκόλλησης K99, K88 και 987P αποτελούν σημαντικό παράγοντα παθογένειας, επειδή τα αντιγόνα αυτά βοηθούν το βακτηριδιακό κύτταρο να προσκολληθεί στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου, έτσι ώστε να μην είναι δυνατή η έκπλυση και η απομάκρυνση του με τις απεκκρίσεις του εντερικού βλεννογόνου, με τη μετακίνηση των τροφών και με τις

περισταλτικές κινήσεις του εντέρου. Με τον πολλαπλασιασμό του μικροοργανισμού παράγεται αντίστοιχα μεγάλη ποσότητα εντεροτοξίνης η οποία επιδρά τοπικά στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου, προκαλεί υπερέκκριση του υγρού, αυξημένη περισταλτική κίνηση και διάρροια. Διάρροιες προκαλούνται σε νεογέννητα που στερούνται ανοσίας, είτε γιατί δεν πήραν πρωτόγαλα από τη μητέρα τους, είτε γιατί αυτή δεν απέκτησε ανοσία, δηλαδή δεν είχε ειδικά αντισώματα στο πρωτόγαλα. (Κουμπατή-Αρτοποιού και συν. 1986).

3.1.9. Εργαστηριακή διάγνωση

Σε επιχρίσματα που γίνονται από παθολογικά υλικά ή από καλλιέργειες, τα βακτηρίδια της *E.coli* εμφανίζονται στο μικροσκόπιο χωρίς συγκεκριμένη διάταξη, είναι Gram αρνητικά και δεν διαφοροποιούνται από τα άλλα εντεροβακτηριοειδή. Η *E.coli* παρουσιάζει πλούσια ανάπτυξη ακόμη και στα πλέον κοινά θρεπτικά υποστρώματα. Οι καλλιέργειες γίνονται συνήθως σε MacConkey- και σε αιματούχο άγαρ.

3.1.10. Πρόληψη

Εξαιτίας της εμφάνισης πολλών περιστατικών σε μικρά παιδιά, θα πρέπει να ληφθούν επιπλέον ειδικά προληπτικά μέτρα. Ιδιαίτερη σημασία λοιπόν, πρέπει να αποδοθεί στην επαρκή θερμική επεξεργασία των τροφίμων, γνωρίζοντας την ευαισθησία της *E. coli* σε υψηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα στη περίπτωση του βόειου κρέατος, η θερμοκρασία του πυρήνα πρέπει να φτάσει το λιγότερο τους 68°C για τουλάχιστον 15 sec. Για παράδειγμα το ψήσιμο των χάμπουργκερ σε θερμοκρασία 68-71°C, θεωρείται επαρκές για την ασφάλεια των καταναλωτών. Βέβαια τα έτοιμα ψημένα χάμπουργκερ καθώς και τα υπόλοιπα είδη κρεάτων, δεν θα πρέπει να παραμένουν σε θερμοκρασίες 4-60°C, για περισσότερο από 3-4 ώρες. Πρέπει να σημειωθεί ότι μολονότι οι περισσότερες επιδημίες που σχετίζονται με τροφιμογενής λοιμώξεις από *E. coli*, σχετίζονται με το βόειο κρέας, όλα τα νωπά κρέατα, πουλερικά και θαλασσινά, θα μπορούσαν να θεωρηθούν μέσα διασποράς της αιμορραγικής κολίτιδας.

3.2. Ανίχνευση στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (παλαιότερες μέθοδοι)

Αρίθμηση κολοβακτηριοειδών και *Esheria coli*

Η αρίθμηση των κολοβακτηριοειδών, καθώς και των εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδών και της *Esheria coli*, μπορεί να γίνει με περισσότερες από μια μεθόδους και με τη χρήση διαφορετικών συνδυασμών θρεπτικών υποστρωμάτων. Επειδή όμως μόνο η θετικότητα στη δοκιμή κολοβακτηριοειδών είναι δυνατό να υποδηλώνει θετικότητα σε εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδή και *Esheria coli*, η μεθοδολογία ανιχνεύσεως – αριθμήσεως εξελίσσεται σε συνεχόμενα στάδια.

Για το λόγο αυτό, εφόσον επιδιώκεται η εξαγωγή αποτελεσμάτων τόσο για κολοβακτηριοειδή όσο και για εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδή ή *Esheria coli*, πρέπει να επιλέγεται η μέθοδος πολλαπλών σωλήνων (μέθοδος MPN).

3.2.1. Παλαιότερες μέθοδοι (τεχνικές)

3.2.1.1. Μέθοδος πολλαπλών σωλήνων ή μέθοδος MPN (*Most Probable Number Method*).

Προετοιμασία του δείγματος και των αραιώσεων:

Ανάλογα με το είδος του τροφίμου που πρόκειται να εξεταστεί γίνεται και η προετοιμασία του.

- Στερεά τρόφιμα: Παίρνονται, από διάφορα σημεία του δείγματος, με άσηπτο τρόπο, τεμάχια συνολικού βάρους 50-10 g και μεταφέρονται σε στείρα ευρύστομη φιάλη ή στείρο ποτήρι ζέσεως, όπου με τη βοήθεια στείρου ψαλιδιού, λεπτοτεμαχίζονται. Από το αντιπροσωπευτικό αυτό δείγμα ζυγίζεται η ποσότητα που θα ομογενοποιηθεί.
- Κατεψυγμένα τρόφιμα: Τα κατεψυγμένα τρόφιμα αποψύχονται σε θερμοκρασία 0-4°C και στη συνέχεια προετοιμάζονται, με την ίδια διαδικασία που έγινε και στα στερεά τρόφιμα. Τα δείγματα δεν πρέπει να παραμείνουν στη θερμοκρασία των 0-4°C για περισσότερο από 18 ώρες. Από την ΑΡΗΑ (1976) προτείνεται σαν εναλλακτική λύση η μη απόψυξη του δείγματος, αλλά η λήψη υλικού από

διάφορα σημεία του με τη βοήθεια στείρου ηλεκτρικού τυμπάνου. Τα τεμάχια που αποσπώνται, συλλέγονται σε ειδικά διαμορφωμένο χωνί. Συλλέγονται έτσι τεμάχια βάρους 50-100 g και μεταφέρονται σε στείρο ποτήρι ζέσεως, όπου υποβάλλονται σε λεπτό τεμαχισμό. Από το τεμαχισμένο αυτό δείγμα ζυγίζεται η ποσότητα που θα ομογενοποιηθεί με το αραιωτικό υγρό.

- Ρευστά ή ημίρευστα δείγματα: Το δείγμα αναμιγνύεται καλά μέσα στον περιέκτη του, με 20-25 αναστροφικές κινήσεις του περιέκτη. Εάν το δείγμα είναι γάλα ή άλλο τρόφιμο της ίδιας ρευστότητας, η ανακίνηση, κατά την ΑΡΗΑ(1978), πρέπει να είναι γρήγορη (25 αναστροφές σε χρόνο 7 sec.). Από το δείγμα αυτό και μέσα σε 3min από τη στιγμή της ανακινήσεως παίρνεται η ποσότητα που θα ομογενοποιηθεί με το αραιωτικό υγρό.

Ομοιογενοποίηση του δείγματος:

Για τα στερεά τρόφιμα, από το δείγμα που προετοιμάστηκε, ζυγίζονται απευθείας στη φιάλη ομοιογενοποίησης 10 g ή 11 g ή 50 g και ομοιογενοποιούνται με 90 ml ή 99 ml ή 450 ml αραιωτικού υγρού αντιστοίχως. Η ομοιογενοποίηση γίνεται είτε σε ηλεκτρικό ομοιογενοποιητή, επί 2min σε ταχύτητα 8.000 rpm είτε με τεχνική Stomacher. Εάν το δείγμα χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να ομοιογενοποιηθεί, τότε γίνονται ενδιάμεσες διακοπές στη λειτουργία του οργάνου για να μην υπερθερμανθεί το δείγμα.

Για τα ρευστά τρόφιμα, αφού προετοιμαστεί το δείγμα όπως αναφέρθηκε παραπάνω, παίρνονται με στείρο σιφόνιο, 1 ml ή 10 ml ή 11 ml και μεταφέρονται σε φιάλη αραιώσεως που περιέχει 9 ml ή 90 ml ή 99 ml αραιωτικού υγρού αντιστοίχως. Ακολουθεί ομοιογενοποίηση με έντονη ανακίνηση της φιάλης με το χέρι σε τόξο 30-35 cm επί 1 min.

Η ομοιογενοποίηση του δείγματος με το αραιωτικό, γίνεται με τέτοιες αναλογίες ώστε συνήθως να προκύπτει αραιώση του δείγματος 1:10. Αυτό όμως δεν είναι υποχρεωτικό. Η αναλογία δείγματος και αραιωτικού, για την πρώτη αραιώση, μπορεί να είναι διαφορετική, οπότε ανάλογα υπολογίζονται και οι επόμενες δεκαδικές αραιώσεις.

Παρασκευή διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων:

- Μετά τη ομοιογενοποίηση του δείγματος και την παρασκευή της αραιώσεως 1:10 γίνονται οι υπόλοιπες δεκαδικές αραιώσεις (1:100, 1:1000 κ.λπ.) με μεταφορά 1

ml ή 10 ml ή 11 ml σε 9 ml ή 90 ml ή 99 ml αραιωτικού. Το σχήμα που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από τον εξοπλισμό του εργαστηρίου. Γεγονός είναι ότι ο μεγαλύτερος όγκος του μεταφερόμενου υγρού αυξάνει την ακρίβεια της μεθόδου.

- Η μεταφορά από τη μία φιάλη στην επόμενη γίνεται με το κατάλληλο ογκομετρικό σιφώνιο, το οποίο δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με το αραιωτικό υγρό της φιάλης στην οποία μεταφέρεται το υλικό του, ούτε να αδειάζεται η τελευταία σταγόνα με φύσημα του σιφωνίου.
- Κάθε φιάλη, αμέσως με τη μεταφορά του δείγματος από την προηγούμενη, ανακινείται ισχυρά. Εάν πρόκειται για φιαλίδια ή δοκιμαστικούς σωλήνες συνίσταται η χρήση κυκλομίκτη.
- Όλες οι αραιώσεις πρέπει να παρασκευαστούν μέσα σε χρόνο 15 min από τη στιγμή της ομοιογενοποίησης του δείγματος.

Κολοβακτηριοειδή

A. Προκαταρκτική δοκιμή:

- Από τις δεκαδικές αραιώσεις που προετοιμάστηκαν και μέσα σε χρόνο 15 min, ενοφθαλμίζεται τριπλή ή πενταπλή σειρά σωλήνων που περιέχουν έναν από τους ειδικούς ζωμούς Lauryl Sulfate Tryptose Broth ή Brilliant Green Lactose Bile Broth ή McConkey Broth.
- Από κάθε αραιώση ενοφθαλμίζονται 3 ή 5 σωλήνες με 1 ml ο καθένας. Προκειμένου για ρευστό τρόφιμο ενοφθαλμίζονται σωλήνες και από το αναρραίοτο δείγμα. Εάν εξετάζεται νερό είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και ενοφθάμισμα 10 ml, αλλά ο ζωμός πρέπει να είναι διπλής συγκεντρώσεως.
- Η επώαση θα γίνεται στους 35-37°C για 24-48 ώρες.
- Θετικοί θεωρούνται οι σωλήνες που παρουσιάζουν ανάπτυξη και συλλογή αερίου στο σωληνάκι Durham. Προκειμένου για το ζωμό McConkey παρατηρείται και αλλαγή του χρώματος του υποστρώματος.
- Σημειώνονται οι θετικοί σωλήνες από κάθε αραιώση και υπολογίζεται ο προκαταρκτικός πληθυσμός MPN κολοβακτηριοειδών με βάση τους πίνακες McCrady.

B. Επιβεβαιωτική δοκιμή:

- Από τους θετικούς σωλήνες της προκαταρκτικής δοκιμής γίνεται ενοφθαλμισμός σωλήνων με ζωμό BGLB ή McConkey (προτιμότερο είναι να μη χρησιμοποιείται ο ίδιος ζωμός της προκαταρκτικής δοκιμής).
 - Οι σωλήνες επωάζονται, στους 35-37°C για 24-48 ώρες.
 - Σημειώνονται οι θετικοί σωλήνες, συγκρίνονται με το αποτέλεσμα της προκαταρκτικής δοκιμής και με βάση τους πίνακες McCrady υπολογίζεται ο αριθμός MPN κολοβακτηριοειδών ανά g ή ml τροφίμου.
 - Η επιβεβαιωτική δοκιμή είναι δυνατόν να γίνει και με χρήση στερεών υποστρωμάτων.
- α). Από τους θετικούς σωλήνες της προκαταρκτικής δοκιμής ενοφθαλμίζονται επιφανειακά με κρίκο τρυβλία με Violet Red Bile Agar ή EBM ή Agar ή Endo Agar και επωάζονται στους 35-37°C για 24 ώρες.
- β). Ο σχηματισμός κόκκινων αποικιών διαμέτρου τουλάχιστον 0,5 mm στο Endo Agar ή το Violet Red Bile Agar, ή η ανάπτυξη μαύρων με μεταλλική απόχρωση αποικιών στο EMB Agar υποδηλώνει θετικότητα για κολοβακτηριοειδή του αντίστοιχου σωλήνα.
- γ). Υπολογισμός του αριθμού των κολοβακτηριδίων.

Εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδή – *Escherichia coli*

- Από κάθε θετικό σωλήνα της επιβεβαιωτικής δοκιμής (ή της προκαταρκτικής δοκιμής) ενοφθαλμίζονται σωλήνες που περιέχουν E.C. Broth και Peptone Water αντιστοίχως.
- Οι σωλήνες τοποθετούνται αμέσως σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ και επωάζονται για 24-48 ώρες.
- Η θερμοκρασία του υδατόλουτρου είναι απαραίτητο να παραμείνει σταθερή (με απόκλιση το πολύ $\pm 0,5^\circ\text{C}$) για όλη τη διάρκεια της επώσεως.
- Μετά την επώαση ελέγχονται οι σωλήνες E.C. Broth για ανάπτυξη και παραγωγή αερίου. Σημειώνονται οι θετικοί σωλήνες και το αποτέλεσμα εκφράζεται με βάση τους πίνακες McCrady ως αριθμός MPN εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδών
- Εκτελείται η δοκιμή ινδόλης στους σωλήνες με Peptone Water.
Θετικότητα στη δοκιμή ινδόλης και ανάπτυξη στο ζωμό E.C., υποδηλώνει θετικότητα του αντίστοιχου σωλήνα της δοκιμής κολοβακτηριοειδών για

Escherichia coli. Τελικά το αποτέλεσμα εκφράζεται ως αριθμός MPN *Escherichia coli* / g. ή ml, με βάση τους πίνακες McCrady.

Υπολογισμός αριθμού MPN (Most Probable Number)

Ο υπολογισμός του αριθμού MPN κολοβακτηριοειδών (αλλά και άλλων ομάδων ή ειδών βακτηρίων) γίνεται με τη βοήθεια των πινάκων McCrady. Οι πίνακες αυτοί δίνουν, με βάση τον αριθμό των θετικών σωλήνων που προκύπτουν από τρεις διαδοχικές αραιώσεις, ένα πιθανό πληθυσμό κολοβακτηριοειδών, ο οποίος, στατιστικώς, είναι «ο περισσότερο πιθανός αριθμός» κολοβακτηριοειδών που περιέχονται στο δείγμα που εξετάστηκε.

Η ορθή χρήση των πινάκων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για το σωστό υπολογισμό του πληθυσμού των κολοβακτηριοειδών ενός δείγματος. Για το σκοπό αυτό έχουν θεσπιστεί ορισμένοι κανόνες οι οποίοι βοηθούν στην εξεύρεση του τριηφίου αριθμού που πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση. Αυτό είναι περισσότερο αναγκαίο όταν χρησιμοποιούνται περισσότερες από τρεις αραιώσεις και υπάρχουν σε όλες θετικοί σωλήνες.

3.2.1.2. Μέθοδος ενσωματώσεως

Προετοιμασία όπως έγινε και στην προηγούμενη μέθοδο.

Κολοβακτηριοειδή

A. Προκαταρκτική δοκιμή:

- Ρευστοποιείται το θρεπτικό υπόστρωμα (Violet Red Bile Agar ή Desoxycholate Lactose Agar ή McConkey Agar) και θερμοστατείται στους 45°C σε υδατόλουτρο.
- Από τις αντίστοιχες αραιώσεις του δείγματος μεταφέρεται ποσότητα 1 ml σε στείρα τρυβλία και ενσωματώνεται με 15 ml περίπου υποστρώματος θερμοκρασίας 45°C περίπου.
- Προκειμένου για ρευστό τρόφιμο είναι δυνατόν να γίνει ενοφθαλμισμός και από το αναρραϊωτό δείγμα.
- Τα τρυβλία επωάζονται στους 35-37°C για 24 ώρες.
- Μετά την επώαση αριθμούνται οι κόκκινες αποικίες. Επιλέγονται για αρίθμηση τα τρυβλία τα οποία έχουν 30-150 αποικίες (ΑΡΗΑ,1976) ενώ κατά τον WHO (1977), αριθμούνται τα τρυβλία που έχουν 20-80 αποικίες. Ο αριθμός των

αποικιών, αφού πολλαπλασιαστεί επί το συντελεστή αραιώσεως, εκφράζει τον αριθμό κολοβακτηριοειδών ανά ml ή g τροφίμου.

B. Επιβεβαιωτική δοκιμή:

Η δοκιμή γίνεται, εφόσον οι αποικίες οι οποίες αναπτύσσονται δεν είναι τυπικές για κολοβακτηριοειδή, οπότε γίνονται οι εξής ενέργειες:

- Από το τρυβλίο που αριθμήθηκε, επιλέγεται αριθμός αποικιών προς την τετραγωνική ρίζα του συνόλου τους και ενοφθαλμίζεται σε σωλήνες με ζωμό McConkey ή BGLB.
- Οι σωλήνες επωάζονται στους 35-37°C για 24-48 ώρες και θεωρούνται θετικοί εφόσον παρουσιάσουν ανάπτυξη και παραγωγή αερίου.
- Με τη βάση το ποσοστό των θετικών αποικιών υπολογίζεται ο αριθμός κολοβακτηριοειδών της επιβεβαιωτικής δοκιμής ανά ml ή g τροφίμου.

Εντερικής προελεύσεως κολοβακτηριοειδή – *Escherichia coli*

Ο προσδιορισμός του αριθμού των κολοβακτηριοειδών με αρίθμηση σε στερεά υποστρώματα, δεν ευνοεί την αρίθμηση *Escherichia coli* και εντερικών κολοβακτηριοειδών, διότι πολλαπλασιάζει το χρόνο εργασίας και τη δαπάνη υλικών. Είναι δυνατόν να γίνει ως εξής:

- Από τους θετικούς σωλήνες της επιβεβαιωτικής δοκιμής ενοφθαλμίζονται σωλήνες με ζωμό E.C. και Peptone Water και επωάζονται στους 44,5°C ± 0,2°C για 48 ώρες.

3.2.1.3. Μέθοδος μικροβιοκρατών μεμβρανών (Membrane Filtration Method)

Είναι μέθοδος η οποία εφαρμόζεται κυρίως για την αρίθμηση κολοβακτηριοειδών στο νερό. Είναι δυνατόν, κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις να χρησιμοποιηθεί και για ορισμένα ρευστά τρόφιμα, αλλά τα προβλήματα που αντιμετωπίζονται κατά τη διήθηση κάνουν δύσκολη την εφαρμογή της.

Προετοιμασία του δείγματος και των αραιώσεων:

Εάν το δείγμα δεν έχει μεγάλο αριθμό κολοβακτηριοειδών, δεν γίνονται αραιώσεις. Σε αντίθετη περίπτωση γίνονται δυο τουλάχιστον αραιώσεις (1:10 και 1:100) με αραιωτικό υγρό φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα.

Τεχνική (WHO,1977):

- Προετοιμάζονται τρυβλία petri που περιέχουν υπόστρωμα M-FC-Agar και M-Endo Agar MF και ξηραίνονται επιφανειακά στους 37°C για 30 min.
- Ελέγχεται το σύστημα διηθήσεως και τοποθετούνται με στείρα λαβίδα οι μεμβράνες στις συσκευές διηθήσεως.
- Διηθούνται εις διπλούν 100 ml και 10 ml από το αναραίωτο δείγμα καθώς και 10ml από τις αραιώσεις 1:10 και 1:100 (εφόσον χρησιμοποιούνται).
- Η μια σειρά φίλτρων τοποθετείται με προσοχή στην επιφάνεια τρυβλίων τα οποία περιέχουν M-FC-Agar ή M-Endo Agar MF και επώαζεται στους 35-37°C για 24±2 ώρες. Αριθμούνται οι κόκκινες αποικίες στο M-Endo Agar MF και οι κυανές στο M-FC-Agar. Το αποτέλεσμα εκφράζει τον αριθμό κολοβακτηριοειδών με βάση τη σχέση:

$$\text{Κολοβακτηριοειδή/100 ml} = \frac{\text{Αριθμός αποικιών}}{\text{ml δείγματος}} \times 100$$

- Η δεύτερη σειρά φίλτρων τοποθετείται σε τρυβλία τα οποία περιέχουν υπόστρωμα M-FC-Agar και επώαζονται στους 44,5±0,2°C σε κλίβανο επώσεως για 24± ώρες. Αριθμούνται οι κυανές αποικίες και το αποτέλεσμα εκφράζει τον πληθυσμό *Escherichia coli* στην αντίστοιχη ποσότητα του δείγματος που διηθήθηκε.
- Η επώαση των φίλτρων προκειμένου για τα κολοβακτηριοειδή είναι δυνατόν να γίνει και σε M-FC Broth. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται ειδικά υδατοστεγή πλαστικά τρυβλία διαμέτρου 50 mm, εφοδιασμένα με απορροφητικό δίσκο (absorbent pad). Ο δίσκος διαποτίζεται με 2 ml ζωμού M-FC και αμέσως πάνω σ αυτόν τοποθετείται το φίλτρο. Η επώαση γίνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 35-37°C στο οποίο τα τρυβλία, αφού κλειστούν ερμητικά, αφήνονται και επιπλέουν. Αριθμούνται οι κυανές αποικίες.

Η μέθοδος παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα εξαιτίας των οποίων δίνει μικρότερους πληθυσμούς κολοβακτηριοειδών, σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους και ιδιαίτερα με τη μέθοδο MPN. (Μάντης – Καραϊωάννου 1980).

3.3. ISO (International Organization for Standardization) 16649-2

- Σκοπός: Οριζόντια μέθοδος για την απαρίθμηση των β-γλυκουρονιδάση-θετικών στελεχών της *Esherichia coli* σε προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση ή για τη διατροφή των ζώων. Στηρίζεται σε μια τεχνική μέτρησης αποικιών στους 44°C σε ένα στερεό υπόστρωμα που περιέχει ένα χρωμογόνο παράγοντα για την ανίχνευση του ενζύμου β-γλυκουρονιδάση.

Σημείωση. Τα στελέχη της *E. coli* τα οποία δεν αναπτύσσονται στους 44°C και συγκεκριμένα, εκείνα τα οποία είναι β-γλυκουρονιδάση-αρνητικά, όπως η *E. coli* 0157, δεν ανιχνεύονται με τη συγκεκριμένη μέθοδο.

- Υπόστρωμα για καλλιέργειες: Tryptone-bile-glucuronic medium (TBX).
- Σύνθεση:

casein	20,0 g
Sats No 3	1,5 g
5-bromo-4-chloro-6-indoyl-3-D-glucuronic acid (BOIG)	144 µmcl
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	3 ml
Agar	9 g έως 18 g
Water	1000 ml

- Προετοιμασία: Διαλύονται τα συστατικά ή το αφυδατωμένο πλήρες υπόστρωμα στο νερό, με τη βοήθεια του βρασμού ρυθμίζεται το pH, εάν απαιτείται, έτσι ώστε μετά την αποστείρωση να είναι $7,2 \pm 0,2$ στους 25°C. Αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min.. Μεταφέρεται άμεσα το υπόστρωμα σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 44-47°C.
- Συσκευές και γυάλινα σκεύη: Αντί για τα επανχρησιμοποιούμενα γυάλινα σκεύη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σκεύη μιας χρήσης, εάν τηρούνται οι κατάλληλες προϋποθέσεις. Απαιτούνται τα ακόλουθα:
 - i) Κλίβανος ξηρής και κλίβανος υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο).
 - ii) Θάλαμος για στέγνωμα των Petri ή κλίβανος που αερίζεται με μεταγωγή θερμότητας και λειτουργεί σε θερμοκρασίες από 37-55°C.
 - iii) Κλίβανος επώασης που λειτουργεί στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

- iv) Υδατόλουτρο που λειτουργεί στους $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ ή κλίβανος επώασης που λειτουργεί στην ίδια θερμοκρασία.
 - v) Υδατόλουτρα που λειτουργούν από τους $44-47^\circ\text{C}$.
 - vi) Υδατόλουτρο που λειτουργεί στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
 - vii) Αποστειρωμένοι κρίκοι διαμέτρου περίπου 3 mm ή των 10 μL , ή αποστειρωμένες πιπέττες.
 - viii) pH-μετρο με ακρίβεια $\pm 0,1$ μονάδες του pH στους $20-25^\circ\text{C}$.
 - ix) Δοκιμαστικοί σωλήνες ή κωνικές φιάλες κατάλληλου όγκου.
 - x) Βαθμονομημένες πιπέττες ή αυτόματες πιπέττες όγκου 10 ml και 1 ml βαθμονομημένες αντίστοιχα με υποδιαιρέσεις του 0,5 και 0,1 ml.
 - xi) Τρυβλία Petri μικρού μεγέθους (διαμέτρου 90-100 mm) και/ή μεγαλύτερου μεγέθους (διαμέτρου 140 mm).
- Δειγματοληψία: Είναι σημαντικό στο εργαστήριο να φτάνει δείγμα το οποίο να είναι πραγματικά αντιπροσωπευτικό και να μην έχει υποστεί αλλοίωση ή καταστροφή κατά την μεταφορά ή την αποθήκευσή του. Η δειγματοληψία δεν αποτελεί τμήμα της μεθόδου που καθορίζεται σε αυτή τη Διεθνή Σταθερά.
 - Προετοιμασία του εξεταζόμενου δείγματος: Εξεταζόμενο δείγμα και αρχικό εναιώρημα: Για την προετοιμασία του αρχικού εναιωρήματος, όσον αφορά τη γενική περίπτωση χρησιμοποιείται ως διαλύτης το προεμπλουτιστικό υπόστρωμα (buffered peptone water). Εάν η καθορισμένη μάζα της εξεταζόμενης ποσότητας είναι άλλη από 25 g, τότε χρησιμοποιείται η ανάλογη ποσότητα του εξεταζόμενου προεμπλουτιστικού υποστρώματος έτσι ώστε η αναλογία να είναι 1/10.

Για να μειωθεί ο φόρτος εργασίας, όταν θα πρέπει να εξεταστούν περισσότερα από ένα δείγματα των 25 g από μία συγκεκριμένη παρτίδα τροφίμου και όταν υπάρχει απόδειξη ότι με ομαδοποίηση τους δεν επηρεάζεται το τελικό αποτέλεσμα όσον αφορά το συγκεκριμένο προϊόν, τότε τα δείγματα μπορούν τελικά να ομαδοποιηθούν. Για παράδειγμα, εάν πρόκειται να εξεταστούν 10 δείγματα των 25g τότε συνδυάζονται οι δέκα μονάδες προκειμένου να δημιουργηθεί ένα σύνθετο δείγμα 250 g στο οποίο προστίθενται 2,25 lt προεμπλουτιστικού υποστρώματος. Εναλλακτικά το 0,1 ml (που προστίθεται στα 10 ml του ζωμού MKTTn) από το προεμπλουτιστικό ζωμό από τα δέκα χωριστά δείγματα μπορούν να συνδυαστούν προς εμπλουτισμό σε 100 ml του εκλεκτικού εμπλουτιστικού υποστρώματος.

- Ενοφθαλμισμός και επώαση: Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη πιπέττα ή αυτόματη πιπέττα ενοφθαλμίζεται σε τρυβλίο πετρί 1 ml του αρχικού δείγματος όταν είναι υγρό ή 1 ml από την πρώτη αραιώση (10^{-1}) στην περίπτωση άλλων δειγμάτων, ενοφθαλμίζονται δυο πετρί από κάθε αραιώση. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία και για τις υπόλοιπες δεκαδικές αραιώσεις, εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη πιπέττα για κάθε αραιώση. Σε κάθε τρυβλίο προσθέτονται 15 ml ρευστού υποστρώματος TBX, το οποίο θερμοστατήθηκε σε υδατόλουτρο 44-47°C. Η ενσωμάτωση του δείγματος με το ρευστό υπόστρωμα γίνεται προσεκτικά και αφήνεται το μίγμα να στερεοποιηθεί με τα τρυβλία να μένουν σε οριζόντια θέση.

Η όλη εργασία από τη στιγμή του ενοφθαλμισμού στο τρυβλίο μέχρι την προσθήκη του υποστρώματος δεν πρέπει να ξεπερνά τα 15 min.. Τα τρυβλία επωάζονται ανεστραμμένα στους 44°C για 18-24 ώρες. Η διάρκεια της επώασης δεν πρέπει να ξεπερνά τις 24 ώρες.

Μετά την επώαση αριθμούνται οι τυπικές αποικίες των β-γλυκουρονιδάση θετικών στελεχών της *E. coli* στα τρυβλία που έχουν λιγότερες από 150 τυπικές αποικίες και λιγότερες από συνολικά 300 αποικίες (τυπικές και μη τυπικές).

Οι τυπικές αποικίες έχουν χαρακτηριστικό μπλε χρώμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

4.1. Γενικά-Ιδιότητες

Το είδος *Clostridium perfringens* ανήκει στην οικογένεια των *Bacillaceae* και στο γένος *Clostridium*. Είναι αναερόβιοι Gram θετικοί βάκιλλοι, είναι ευρέως διαδεδομένοι στο περιβάλλον και συχνά βρίσκονται στο έντερο του ανθρώπου, πολλών κατοικίδιων και άγριων ζώων.

4.1.1. Μορφολογία

Είναι βάκιλλοι αρκετά μεγάλοι, με άκρα ελαφρά αποστρογγυλεμένα. Είναι ελυτροφόρα και ακίνητα, Gram θετικά. Οι σπόροι τους είναι ωοειδείς κεντρικοί ή παραπολικοί και παραμορφώνουν το βακτηριακό κύτταρο. (Μαζαράκη 2008).



4.1.2. Κατανομή στη φύση

Τα *Clostridium perfringens* είναι πολύ διαδομένα στη φύση (περισσότερο από κάθε αναερόβια) και θα μπορούσαμε να πούμε ότι βρίσκονται παντού, στο έδαφος, στη λάσπη των ποταμών και των λιμνών, στους υπονόμους, στη θάλασσα, στη σκόνη και στο έντερο των ανθρώπων και όλων σχεδόν των ζώων, ακόμη και των ψαριών.

4.1.3. Ανθεκτικότητα

Από το φυσικό τους περιβάλλον ρυπαίνουν τα τρόφιμα, φυτικά και ζωικά και εισβάλλουν στους ζωντανούς οργανισμούς. Οι βλαστικές μορφές των *Clostridium*

perfringens είναι αρκετά ανθεκτικές στη θερμοκρασία, καταστρέφονται στους 80°C σε 10 min. Αντίθετα οι σπόροι καταστρέφονται, οι περισσότεροι στους 100°C σε 5-10 min, εκτός από τους σπόρους μερικών στελεχών (τύποι C και A) που αντέχουν στους 100°C για μία ώρα ή και περισσότερο.

4.1.4. Αντιγόνα

Τα *Clostridium perfringens* έχουν σωματικά αντιγόνα και ένα πολυσακχαριδικό αντιγόνο του ελύτρου. Η υποδιαίρεση των διάφορων στελεχών δεν γίνεται σε αντιγονικούς (με βάση τα αντιγόνα) αλλά σε τοξινικούς τύπους, με βάση τις τοξίνες που παράγουν τα διάφορα στελέχη. Διακρίνονται 5 τοξινικοί τύποι, οι A, B, C, D και E.

Οι διάφορες τοξίνες που παράγονται από τους παραπάνω τοξινικούς τύπους έχουν μελετηθεί και χαρακτηρίζονται με τα μικρά γράμματα του ελληνικού αλφαβήτου, από το α μέχρι το ν. Οι κυριότερες είναι οι α, β, ε και οι οποίες είναι πρωτεϊνικής φύσεως, είναι αντιγονικές και με την προσθήκη φορμόλης μετατρέπονται σε ανατοξίνες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά εμβολίων.

4.1.5. Τοξίνες

Πρωτεύουσες τοξίνες

α – Τοξίνη. Είναι η κύρια θανατηφόρα τοξίνη του τύπου A, παράγεται όμως σε μικρότερες ποσότητες απ' όλους τους τύπους. Είναι λεκιθινάση (φωσφολιπάση C), είναι σχετικά θερμοάντοχη αλλά ευαίσθητη στη δράση της θρυψίνης. Η δράση αυξάνεται παρουσία ιόντων Ca^{++} και Mg^{++} . Υδρολύει τα φωσφολιπίδια (κυτταρική μεμβράνη, μιτοχόνδρια, λυσοσώματα) και προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο. Έχει ιδιότητες αιμολυτικές, νεκρωτικές και θανατηφόρες.

β – Τοξίνη. Παράγεται σε σημαντικές ποσότητες από τους τύπους B και C. Ο τύπος C (παλιός τύπος F) παράγει σε μικρή ποσότητα τη β – τοξίνη. Είναι ευαίσθητη στη δράση της θερμότητας και της θρυψίνης. Έχει θανατηφόρες και νεκρωτικές ιδιότητες, όχι όμως αιμολυτικές. Προκαλεί νέκρωση στους ιστούς και αιμορραγική εξέλκωση ή νέκρωση του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου.

ε – Τοξίνη. Αποτελεί τον κύριο τοξικό παράγοντα του τύπου D, από τον οποίο παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τον τύπο B.

Παράγεται ως προτοξίνη και μετατρέπεται σε τοξίνη με τη δράση της θρυψίνης του εντέρου. Έχει νεκρωτικές και θανατηφόρες ιδιότητες και προκαλεί βλάβες στο ενδοθήλιο των αγγείων με αποτέλεσμα οίδημα και νέκρωση διάφορων ιστών (οίδημα στον εγκέφαλο, πολτοποίηση νεφρών).

ι – Τοξίνη. Παράγεται ως προτοξίνη μόνο από τον τύπο E και μετατρέπεται σε τοξίνη με τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων (θρυψίνη). Έχει θανατηφόρες και νεκρωτικές ιδιότητες και προκαλεί νέκρωση του εντερικού βλεννογόνου.

Δευτερεύουσες τοξίνες

γ – Τοξίνη. Παράγεται μόνο από μερικά στελέχη των τύπων B και C. Είναι θανατηφόρα και νεκρωτική.

δ – Τοξίνη. Παράγεται σταθερά από τα στελέχη του τύπου C και από μερικά στελέχη του τύπου B. Είναι θανατηφόρα και αιμολυτική.

η και θ – τοξίνες. Η **η – τοξίνη** παράγεται μόνο από μερικά στελέχη του τύπου A και έχει μικρή θανατηφόρο δράση. Η **θ – τοξίνη** παράγεται απ' όλα τα στελέχη του *Clostridium perfringens* που απομονώνονται από τα ζώα, αλλά κυρίως από τον τύπο C και λιγότερο από τους υπόλοιπους. Είναι μια θερμοευαίσθητη και οξυγονοευαίσθητη αιμολυσίνη και έχει νεκρωτικές ιδιότητες σε μεγάλες δόσεις.

κ – Τοξίνη. Υδρολύει το κολλαγόνο (κολλαγενάση) και παράγει κυρίως τύπους A, C και E.

λ – Τοξίνη. Παράγεται κυρίως από τους τύπους B και E και υδρολύει τις πρωτεΐνες ενώ η **μ – τοξίνη** είναι μια υαλουρονιδάση και η **ν τοξίνη** είναι δεσοξυριβοζονουκλεάση (ένζυμα).

Εντεροτοξίνη. Η εντεροτοξίνη παράγεται μόνο από τους τύπους A και C και η παραγωγή της αρχίζει στο στάδιο της σπορογονίας και ελευθερώνεται μαζί με το σπόρο κατά τη λύση του βακτηριακού κυττάρου. Είναι υπεύθυνη των τροφικών λοιμώξεων του ανθρώπου και φαίνεται ότι παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεια της εντεροτοξιναιμίας των μηρυκαστικών.

4.1.6. Παθογόνος δράση

Τα *Clostridium perfringens* προσβάλλουν τα μηρυκαστικά και το χοίρο, αλλά κυρίως τα αιγοπρόβατα στα οποία προκαλούν λοιμώξεις γνωστές ως εντεροτοξιναιμίες. Στον άνθρωπο προκαλούν τροφοτοξινώσεις από την κατανάλωση τροφίμων.

4.1.7. Εργαστηριακή διάγνωση

Για την εργαστηριακή (микροβιολογική) διάγνωση απαραίτητη προϋπόθεση είναι το πτώμα να είναι πρόσφατο, γιατί μεταθανάτια πολλαπλασιάζονται γρήγορα τα κλωστηρίδια της εντερικής χλωρίδας του ζώου και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι δύσκολη.

Για την άμεση μικροσκοπική εξέταση γίνονται επιχρίσματα, από το περιεχόμενο του λεπτού εντέρου και βάφονται κατά Gram. Σε περίπτωση εντεροτοξιναιμίας τα κλωστηρίδια είναι άφθονα ενώ σε υγιή άτομα είναι λίγα ή σπάνια. Παρατηρούνται βακτηρίδια θετικά κατά Gram, μόνα ή σε ζεύγη, ευθέα με άκρα ελαφρά αποστρογγυλεμένα. Συχνά φαίνεται το έλυτρο γύρω από το κλωστηρίδιο. Σπόροι δεν παρατηρούνται, γιατί το *Clostridium perfringens* σπορογονεί δύσκολα στους ιστούς. Για τη σπορογονία του απαιτεί ειδικά υποστρώματα.

Καλλιέργεια γίνεται από παθολογικά υλικά σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα και η επώαση σε αναερόβιες συνθήκες. Επειδή όμως το *Clostridium perfringens* δεν είναι απόλυτα αναερόβιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν υποστρώματα που εξασφαλίζουν την αναεροβίωση και η επώαση να γίνει αερόβια. Η θερμοκρασία επώασης κυμαίνεται από 37 – 38°C με άριστο το 43 – 47°C.

Στην επιφάνεια στερεών υποστρωμάτων δίνει αποικίες κυκλικές, λείες, κυρτές και αδιαφανείς με διάμετρο 2 – 3 mm.

Στο αιματούχο άγαρ γύρω από τις αποικίες παρατηρείται μια λεπτή ζώνη πλήρους αιμολύσεως και μια πλατιά, μερικής αιμολύσεως. **(Κουμπατή-Αρτοποιού και συν. 1986).**

4.1.8. Πρόληψη

Μετά από πρόκληση επιδημίας κλωστηριδίασης, από κατανάλωση γαλοπούλας, σε σχολείο της Αμερικής κατά την οποία το 80% των μαθητών και καθηγητών αρρώστησαν, ο Bryan και συν. πρότειναν τα παρακάτω σημαντικά σημεία ορθής μαγειρικής παρασκευής της γαλοπούλας και της σάλτσας η οποία χρησιμοποιήθηκε:

- 1) Μαγείρεμα της γαλοπούλας, έως ότου η θερμοκρασία στο εσωτερικό του στήθους, φτάσει τουλάχιστον τους 74°C ή ακόμα υψηλότερα.
- 2) Καλή πλύση όλων των περιεκτών και εργαλείων τα οποία ήρθαν σε επαφή με το νωπό κρέας.

- 3) Καλό πλύσιμο των χεριών και χρήση γαντιών κατά την επεξεργασία (π.χ. αποστέωση, τεμαχισμός) του νωπού και μαγειρεμένου κρέατος.
- 4) Διαχωρισμός του μαγειρεμένου κρέατος και του ζωμού πριν την ψύξη.
- 5) Ψύξη του μαγειρεμένου κρέατος και του ζωμού όσο το δυνατόν συντομότερα, μετά το τέλος του μαγειρέματος.
- 6) Χρησιμοποίηση ρηχών σκευών, για τη συσκευασία και συντήρηση του ζωμού και της αποστεωμένης γαλοπούλας στο ψυγείο.
- 7) Βρασμός του ζωμού πριν τη παρασκευή της σάλτσας.

4.2. Ανίχνευση στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (παλαιότερες μέθοδοι)

4.2.1. Παλαιότερες μέθοδοι (τεχνικές)

Αρίθμηση του *Clostridium perfringens*

Προετοιμασία του δείγματος και των αραιώσεων:

Γίνονται όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στην αρίθμηση των κολοβακτηριοειδών και της *Escherichia coli*. Όταν πρόκειται να αριθμηθούν μόνο οι σπόροι του *Clostridium perfringens*, τότε οι φιάλες που περιέχουν τις διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (ή μέρος του περιεχομένου τους όταν πρόκειται για μεγάλες φιάλες) τοποθετούνται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 80°C για 20 min και αμέσως ψύχονται σε παγόλουτρο κάτω από 5°C. Με αυτόν τον τρόπο, αφενός μεν καταστρέφονται οι βλαστικές μορφές, αφετέρου δε ενεργοποιούνται οι σπόροι.

4.2.1.1. Μέθοδος ενσωματώσεως

Η μέθοδος αυτή έχει πολύ μεγάλη εφαρμογή στην καθημερινή πράξη. Γίνεται σε δυο φάσεις. Στην πρώτη φάση γίνεται αρίθμηση των θειοαναγωγικών κλωστηριδίων με βάση την αναγωγή των υποθειωδών και μεταδιθειωδών ενώσεων, σε θειούχες και το σχηματισμό τελικά μαύρου θειούχου σιδήρου, ο οποίος χρωματίζει τις αποικίες μαύρες. (Στη φάση αυτή υπάρχει η πιθανότητα να χρωματιστούν μελανές και αποικίες άλλων θειοαναγωγικών αναερόβιων βακτηρίων τα οποία δεν αναστέλλονται από τις εκλεκτικές ουσίες του υποστρώματος).

Η αρίθμηση των αποικιών που ανήκουν στο *Clostridium perfringens* γίνεται στη δεύτερη φάση.

Φάση αριθμώσεως των θειοαναγωγικών κλωστηριδίων

Από τις κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του τροφίμου ενοφθαλμίζεται διπλή σειρά τρυβλίων petri με όγκο ενοφθαλμίσματος 1 ml. Το ενοφθάμισμα με κατάλληλες κινήσεις ενσωματώνεται με 15-20 ml ρευστού υποστρώματος Sulfite-Polymyxin-Sulfadiazine Agar ή Oleandomycin-Polymyxin-Sulfadiazine Agar ή Tryptose-Sulfite-Cycloserine Agar, θερμοκρασίας 45°C περίπου. Μετά τη στερεοποίηση του υποστρώματος δημιουργείται στο τρυβλίο στιβάδα επικάλυψης με την προσθήκη ποσότητας 5-8 ml από το ίδιο υπόστρωμα.

Επώαση: Στους 37°C για 24 ώρες αναεροβίως.

Ανάγνωση αποτελέσματος: Στα υποστρώματα SPS Agar, OPSP Agar και TSC Agar τα θειοαναγωγικά κλωστηρίδια ανάγουν τις υποθειώδεις ή μεταθειώδεις ενώσεις και σχηματίζουν μαύρες αποικίες. Στο υπόστρωμα TSC Agar εφόσον έχει ενσωματωθεί λέκιθος αυγού, ορισμένες αποικίες παρουσιάζουν επιπλέον και την αντίδραση της λεκιθινάσης.

Φάση ταυτοποίησης και αριθμώσεως του *Clostridium perfringens*

Από κάθε τρυβλίο της πρώτης φάσης το οποίο αριθμήθηκε, επιλέγεται αριθμός αποικιών ίσος με την τετραγωνική ρίζα του συνόλου τους ή όλες οι αποικίες εφόσον ο αριθμός τους είναι μικρότερος από 10, ενοφθαλμίζονται σε υπόστρωμα Cooked Meat Medium ή σε ζωμό Thioglycolate για να ταυτοποιηθούν με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

Μορφολογία: Κλωστηρίδιο θετικό κατά Gram διαστάσεων 0,9-1,3X3-9 μm με αμβλέα ορθογώνια άκρα, σπόροι (εφόσον υπάρχουν) ωοειδείς, μη παραμορφωτικοί, παραπολικοί.

Παραγωγή υδρόθειου (H ₂ S)	(+)
Παραγωγή λεκιθινάσης	(+)
Ζύμωση της λακτόζης	(+)
Αναεροβίωση	(+)
Κινητικότητα	(-)
Αναγωγή των νιτρικών	(±)

Αναστολή δράσεως της λεκιθινάσης (+)

Από τα μέχρι σήμερα γνωστά, από τα κλωστηρίδια που παράγουν λεκιθινάση μόνο το *Clostridium perfringens* έχει την ικανότητα της ζύμωσης της λακτόζης. Η ικανότητα αναγωγής των νιτρικών αλάτων δεν αποτελεί σταθερό χαρακτηριστικό.

Έκφραση τελικού αποτελέσματος:

Ο πληθυσμός του *Clostridium perfringens* υπολογίζεται τελικά πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των αποικιών που χαρακτηρίστηκαν ως θειοαναγωγικές επί το ποσοστό των αποικιών οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ως *Clostridium perfringens* και το γινόμενο επί το συντελεστή αραιώσεως.

4.2.1.2. Μέθοδος επιφανειακής εξαπλώσεως

Ορισμένοι ερευνητές χρησιμοποιούν τη μέθοδο της επιφανειακής εξαπλώσεως αντί για τη μέθοδο της ενσωματώσεως. Χρησιμοποιούνται τα ίδια στερεά υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιούνται και στη μέθοδο της ενσωματώσεως, στην επιφάνεια των οποίων γίνεται εξάπλωση 0,2ml από τις κατάλληλες αραιώσεις του δείγματος με τη βοήθεια γυάλινης κεκαμμένης ράβδου. Στη συνέχεια αφού απορροφηθεί το ενοφθάλμισμα γίνεται επιστιβάδευση ποσότητας 5-8ml από το ίδιο υπόστρωμα για να σχηματιστεί στιβάδα επικάλυψης.

Μετά την αρίθμηση των θειοαναγωγικών κλωστηριδίων γίνεται η ταυτοποίηση και αρίθμηση του *Clostridium perfringens*.

4.2.1.3. Μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων

Η μέθοδος αυτή προορίζεται για τρόφιμα με σχετικά χαμηλά επίπεδα μόλυνσεως με *Clostridium perfringens*.

Η μέθοδος γίνεται σε δυο φάσεις: Η πρώτη είναι η εμπλουτιστική φάση, ενώ η δεύτερη αποτελεί την επιβεβαιωτική δοκιμή.

Προκαταρκτική δοκιμή (εμπλουτιστική φάση):

Από τις κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις για τον ενοφθαλμισμό τριπλής ή πενταπλής σειράς σωλήνων οι οποίοι περιέχουν Cooked Meat Medium ή Liquid Sulfite Cycloserine Medium. Όταν πρόκειται να ενοφθαλμιστούν 10ml (1 g) από την αραιώση 10^{-1} στερεού τροφίμου ή 10 ml υγρού τροφίμου, τότε η πρώτη σειρά σωλήνων περιέχει 10ml υπόστρωμα

διπλής συγκεντρώσεως. Στις υπόλοιπες σειρές χρησιμοποιείται υπόστρωμα κανονικής συγκεντρώσεως ενώ ο όγκος του ενοφθαλμίσματος είναι 1 ml από τις αντίστοιχες αραιώσεις.

Οι σωλήνες οι οποίοι περιέχουν το υπόστρωμα, προτού ενοφθαλμιστούν, θερμαίνονται για χρόνο 10 min στους ατμούς υδατόλουτρου θερμοκρασίας 100°C και αμέσως μετά ψύχονται σε κρύο νερό για να απομακρυνθεί ο αέρας που είναι διαλυμένος στο υπόστρωμα.

Επάωση: Στους 37°C για 24 ώρες αναεροβίως.

Ανάγνωση αποτελέσματος: Στους σωλήνες οι οποίοι περιέχουν το Cooked Meat Medium, η ανάπτυξη υποδηλώνεται με το θόλωμα του υποστρώματος χωρίς να επέλθει μεταβολή του χρώματος. Αντίθετα στους σωλήνες που περιέχουν το LSC Medium η ανάπτυξη υποδηλώνεται με το σχηματισμό μαύρου χρώματος. Οι σωλήνες που δεν παρουσιάζουν μαύρο χρώμα στο πρώτο 24ωρο παραμένουν 24 επιπλέον ώρες στην επάωση.

Επιβεβαιωτική δοκιμή:

Από τους σωλήνες της προκαταρκτικής δοκιμής που παρουσιάζουν ανάπτυξη ή μαύρο χρώμα, γίνεται σπορά, με τη βοήθεια κρίκου με τρόπο ώστε να αναπτυχθούν απομονωμένες αποικίες, σε ένα από τα στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την αρίθμηση των θειοαναγωγικών κλωστηριδίων. Γίνεται επιστιβάδευση μικρής ποσότητας από το ίδιο υπόστρωμα.

Από κάθε τρυβλίο επιλέγονται 1-2 τυπικές αποικίες και υποβάλλονται σε ταυτοποίηση για *Clostridium perfringens*. Θετική αποικία υποδηλώνει θετικότητα του αντίστοιχου τρυβλίου και συνεπώς του σωλήνα της αντίστοιχης αραιώσεως.

Το αποτέλεσμα υπολογίζεται από τους πίνακες McCrady.

4.2.1.4. Μέθοδοι αναεροβιώσεως

Συνθήκες αναεροβιώσεως για την αρίθμηση του *Clostridium perfringens* και γενικά για τα περισσότερα βακτήρια τα οποία αναπτύσσονται κάτω από αναερόβιες συνθήκες, είναι δυνατό να εξασφαλισθούν με τις παρακάτω τεχνικές:

Τα ενοφθαλμισμένα υποστρώματα τοποθετούνται μέσα σε ειδικά δοχεία αναεροβιώσεως, από τα οποία αφαιρείται ο ατμοσφαιρικός αέρας με τη βοήθεια απορροφητικής αντλίας μέχρι να επιτευχθεί κενό 760 mm υδραργύρου (μέτρηση με μεταλλικό μανόμετρο). Στη συνέχεια γεμίζονται με μίγμα αερίου και σε πίεση λίγο

μικρότερη από την ατμοσφαιρική. Ακολουθούν δυο διαδοχικά αδειάσματα και γεμίσματα και τα δοχεία παραμένουν γεμάτα με το μίγμα του αερίου.

Το μίγμα του αερίου που χρησιμοποιείται έχει την παρακάτω σύνθεση:

Άζωτο (N ₂)	88%
Υδρογόνο (H ₂)	2%
Διοξείδιο του άνθρακα (CO ₂)	10%

Για να δεσμεύσουμε τα ίχνη του οξυγόνου που απομένουν (παρ' όλο που αυτό δεν είναι απαραίτητο στη περίπτωση του *Clostridium perfringens*, τοποθετείται μέσα στο δοχείο αναεροβιώσεως ένα ποτήρι με ατσαλόσυρμα ποτισμένο με το παρακάτω διάλυμα:

Θεικός χαλκός (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0.5 g
Tween	0.25 g
D.W.	100.0 ml
Ph 1.5 ρυθμισμένο με Θεικό οξύ (H ₂ SO ₄)	

Επίσης χρησιμοποιούνται τα ειδικά δοχεία αναεροβιώσεως GASPACK της BBL με το ειδικό αντιδραστήριο δεσμεύσεως του οξυγόνου, ή οποιαδήποτε άλλη μέθοδος που περιγράφεται στα εγχειρίδια μικροβιολογίας.

Ως δείκτης αναεροβιώσεως είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ο ειδικός δείκτης της BBL (GASPACK Disposable Anaerobic Indicator) ή οποιοσδήποτε άλλος δείκτης, που βασίζεται στην αναγωγή του κυανού του μεθυλενίου. **(Μάντης – Καραϊωάννου 1980).**

4.3. ISO (International Organization for Standardization) 7937:1997

- Σκοπός: η απαρίθμηση των ζώντων στελεχών *Clostridium perfringens*.
- Υπόστρωμα για καλλιέργειες: Egg-yolk-free tryptose-sulfite-cycloserine agar (SC).
- Σύνθεση:

Tryptose	15,0 g
Soytone	5,0 g
Yeast extract	5,0 g
Disodium disulfite (Na ₂ S ₂ O ₅), anhydrous	1,0 g
Ammonium iron (III) citrate	1,0 g
Agar	9,0 g έως 18,0 g
Water	1000 ml

- Συσκευές και γυάλινα σκεύη: Τζάρες (jars) αναεροβίωσης ή οποιοδήποτε άλλο σκεύος κατάλληλο για καλλιέργεια σε αναερόβιες συνθήκες.
- Δειγματοληψία: Προετοιμασία του εξεταζόμενου δείγματος.
- Διαδικασία: Εξεταζόμενο δείγμα και αρχικό εναιώρημα.
- Ενοφθαλμισμός και επώαση: Μετά τη στερεοποίηση του μίγματος, γίνεται επιστιβάδευση με άλλα 10 ml από το ίδιο υπόστρωμα. Αφήνουμε πάλι το μίγμα να στερεοποιηθεί.

Τα τρυβλία τοποθετούνται σε τζάρες αναεροβίωσης και επωάζονται στους 35 ή 37 °C για 20 ± 24 ώρες. Η επώαση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα το μαύρισμα των πετρί σε μεγάλη έκταση.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τις υπόλοιπες δεκαδικές αραιώσεις.

Μετά το τέλος του χρόνου επώασης επιλέγονται τα τρυβλία με λιγότερες από 150 αποικίες σε όλες τις αραιώσεις και, αν είναι δυνατό, σε διαδοχικές αραιώσεις.

Σε κάθε τρυβλίο αριθμούνται οι τυπικές μαύρες αποικίες του *C perfringens*.

Επιλέγονται πέντε χαρακτηριστικές αποικίες από κάθε τρυβλίο, το οποίο έχει κρατηθεί για την αρίθμηση. Αν είναι διαθέσιμες λιγότερες από πέντε αποικίες σε κάθε τρυβλίο, επιλέγονται όλες οι χαρακτηριστικές αποικίες. Ακολουθεί επιβεβαίωση.

- Βιοχημική επιβεβαίωση: Κάθε επιλεγόμενη αποικία ενοφθαλμίζεται σε ζωμό fluid thioglycollate. Οι σωλήνες επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 35°C για 18±24 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης μεταφέρονται με αποστειρωμένη πιπέττα, πέντε σταγόνες από κάθε σωλήνα σε άλλους σωλήνες με ζωμό LS. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο 46 °C για 18-24 ώρες.

Μετά το τέλος της επώασης, οι σωλήνες με ζωμό LS ελέγχονται για την παραγωγή αερίου και την παρουσία μαύρου χρωματισμού (καθίζηση του θειούχου σιδήρου). Ως θετικοί εκλαμβάνονται οι σωλήνες των οποίων τα σωληνάκια Durham έχουν καταληφθεί από αέριο κατά το ¼ ή και περισσότερο, όπως επίσης και οι σωλήνες που εμφανίζουν μαύρο ίζημα.

Σε περίπτωση αμφιβολίας, όταν οι σωλήνες Durham έχουν καταληφθεί από αέριο σε λιγότερο από το ¼ του όγκου τους, ακόμη κι όταν ο ζωμός έχει εμφανίσει μαύρο χρωματισμό, μεταφέρονται, χωρίς καθυστέρηση με αποστειρωμένη πιπέττα πέντε σταγόνες από κάθε σωλήνα LS νέο σωλήνα με τον ίδιο ζωμό (LS). Ακολουθεί επώαση των σωληνίων σε υδατόλουτρο 46°C για 18-24 ώρες και ανάγνωση του αποτελέσματος του σωλήνες όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, οι σωλήνες θεωρούνται αρνητικοί.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στη συγκεκριμένη εργασία αναφέρονται τα αποτελέσματα που αφορούσαν μέρος μόνο των δειγμάτων που εξετάστηκαν στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος. Επίσης τα αποτελέσματα αφορούν μόνο την ανίχνευση *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* σε νωπό κιμά.

Υλικά και μέθοδοι:

Συνθήκες συντήρησης – δειγματοληψία

Τα δείγματα νωπού κιμά προέρχονται από κρεοπωλεία της Θεσσαλονίκης, τα δείγματα του κιμά προέρχονταν από χοίρειο και βόειο κρέας, καθώς και από μίγμα τους. Την ημέρα κοπής – παρασκευής του κιμά τα δείγματα μεταφέρονται σε ισοθερμικό δοχείο υπό συνθήκες ψύξης στο εργαστήριο και αμέσως μετά άρχισε η επεξεργασία τους.

Μικροβιολογικές εξετάσεις:

Παρασκευή των δεκαδικών αραιώσεων

Ποσότητα 25 g της σάρκας λαμβανόταν άσηπτα από διάφορα σημεία του δείγματος και ομοιογενοποιούνταν για 2 min σε συσκευή Stomacher (Lab-blender 400), με 225 ml Peptone Water (πεπτόνη 0,1%). Από την αραιώση που προέκυπτε, παρασκευάζονταν οι υπόλοιπες δεκαδικές αραιώσεις.

Αρίθμηση *Escherichia coli*

Χρησιμοποιήθηκε η ISO 16649-2 (βλ. κεφ. 3.3.)

Αρίθμηση *Clostridium perfringens*

Χρησιμοποιήθηκε η ISO 7937:1997 (βλ. κεφ. 4.3.)

Αποτελέσματα συζήτηση:

Σε κανένα από τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν δεν ανιχνεύθηκαν τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Clostridium perfringens*. Η απουσία των συγκεκριμένων μικροοργανισμών θα μπορούσε να αποδοθεί στην καλή μικροβιολογική κατάσταση του κρέατος, που χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για την

παρασκευή του κιμά, όπως επίσης στις γενικότερα καλές συνθήκες υγιεινής των αντίστοιχων κρεοπωλείων (συντήρηση, μηχανή κοπής, μαχαίρια, πάγκοι, κ.λπ.), βέβαια θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων τα οποία εξετάστηκαν αποτέλεσαν μέρος της συγκεκριμένης έρευνας θεωρείται μικρός κι επομένως μη αντιπροσωπευτικός.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενόγλωσση:

Ali and Fung (1991). "Occurrence of *Clostridium perfringens* in ground beef and ground turkey evaluated by three methods", *Journal of Food Safety*, 11, 197-203.

Doyle M. P., Beuchat L. R. and Montrille T. J. (2001). "Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers". 2nd Edition ASM Press. Washington, D.C. p. 100.

Farber J. M. and Peterkin P. I. (1991). "Listeria monocytogenes, a foodborne pathogen". *Microbiological Reviews*, 55, 476-511.

Gashe B. A. and Mpuchane S. (2000). "Prevalence of Salmonella on beef products at butcheries and their antibiotic resistance profiles". *Journal of Food Science*, 65, 880-883.

Heredia N., Garcia S., Rojas G. and Salazar L. (2001). "Microbiological condition of ground meat related in Monterrey, Mexico". *Journal of Food Protection*, 64, 1249-1251.

Jay J. M., Loessner M. J. and Golden D.A. (2005) *Modern Food Microbiology*" 6th Edition. Spinger Science and Business Media. Inc. New York USA.

Maaben C. and Stolle A. (2005). "Incidence of Salmonella in minced meat produced in an EU approved cutting plant". *Fleischwirtschaft*, 2, 96-98.

Mossel D. A. A., Corry J. E. L., Struilk C. B. and Baird R. M. (1995). "Essentials of the Microbiology of Foods. A Textbook for Advanced Studies". John Wiley & Sons Ltd. Chischester, England, p. 358.

Roberts T. A., Britton C. R. and Hudson W. R. (1980). "The bacteriological quality of minced meat in the U.K." *Journal of Hygiene* (Cambridge), 85, 211-217.

USDA (1996). "Nation wide Federal Plant Raw Ground Beef. Microbiological Survey". Washington, D. C.: USDA.

International Commission on Microbiological Specification of Food (ICMSF), "Microorganisms in Foods 4: applications of the hazard analysis critical point (HACCP) system to ensure microbiological safety and quality", Black-well Scientific Publication, Oxford 1998.

Ελληνική:

Εφημερίδα της Κυβερνήσεως, Προεδρικό Διάταγμα υπ' αριθμών 286, Αρ. φύλλου 210, (14 Οκτωβρίου 1997).

Εφημερίδα της Κυβερνήσεως, Προεδρικό Διάταγμα υπ' αριθμών 410, Αρ. φύλλου 210, (23 Δεκεμβρίου 1994), Παράρτημα Α', Κεφάλαια I, III, V, και XI (Σημείο 50, Άρθρο 3-10).

Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης: Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής της 15^{ης} Νοεμβρίου 2005 «περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα».

Ελευθεριάδου Α., (2008) “Τεχνολογία Κρέατος Θεωρία”, Θεσσαλονίκη.

Κουμπατή-Αρτοποιού, Σαρρής, Ηλιάδης, Μπουρτζή-Χατζοπούλου, (1986) “Μαθήματα Γενικής & Ειδικής Μικροβιολογίας”, Θεσσαλονίκη.

Μάντης Α. – Καραϊωάννογλου Πρ., (1980) “Εργαστηριακή μικροβιολογία τροφίμων”, Θεσσαλονίκη.

Πανέτσος Α., (1978) “Υγιεινή τροφίμων ζωικής προέλευσης”, (4^η Έκδοση), Θεσσαλονίκη.

Ηλεκτρονική:

<http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/CperCdiff.html>

<http://www.ericbrc.org/portal/eric/ecoli>

<http://www.google.gr/>

