



National Institute for Public Health
and the Environment
Ministry of Health, Welfare and Sport

Η επίδραση της ομαδοποίησης δειγμάτων κρέατος πουλερικών στην ανίχνευση *Salmonella*

Kirsten Mooijman
Wendy van Overbeek
Annemarie Pielaat

Μετάφραση: Ν. Μουττωτού





Υπόβαθρο

- Καν. Νο 2073/2005 EC περιγράφει την απουσία *Salmonella* στο κρέας πουλερικών από το 2010
- Άλλοι Κανονισμοί 1086/2011 θέτουν τους κανόνες για: Απουσία *Imonella* Typhimurium (συμπεριλαμβανομένου «monophasic-STM»: 1,4,[5],12:i:-) και *Salmonella* Enteritidis σε 5 δείγματα των 25 g φρέσκου κρέατος (κοτόπουλα και ινδόρνιθες)
- Ζητήθηκε αυτά τα 5 δείγματα να **ομαδοποιηθούν**. Γι' αυτό η επίδραση της ομαδοποίησης κρέατος πουλερικών στην ευαισθησία της ανίχνευσης *Salmonella* **χρειάζεται να μελετηθεί**

→ οι πειραματισμοί έγιναν στο EURL-*Salmonella*



Βάση πειραματισμού

Οι πειραματισμοί βασίστηκαν στο πρωτόκολλο (προσχέδιο) ομαδοποίησης δειγμάτων του προτύπου ISO/TC34/SC9 WG2 (Statistics):

- Δύο μέθοδοι ομαδοποίησης:
 - «Ξηρή» ομαδοποίηση: ομαδοποίηση του δείγματος
 - «Υγρή» ομαδοποίηση: ομαδοποίηση των προεμπλουτιστικών
 - Ενοφθαλμισμός του δείγματος με χαμηλούς αριθμούς στελεχών που έχουν υποστεί στρες (περίπου 5 cfu/25 g)
 - Το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί τουλάχιστο 5 φορές, (ιδανικά όμως 8-10 φορές) με διαφορετικά δείγματα ίδιου είδους υλικού/ και συνδυασμού μικροοργανισμού
- Επανάληψη με διαφορετικά στελέχη ή ορότυπους μικροοργανισμού



Πειραματικός σχεδιασμός

- 2 στελέχη από κάθε ένα από τους 3 ορότυπους (SE, STM, 1,4,[5],12:i:-)
- 3 διαφορετικοί τύποι «καταπόνησης» για κάθε στέλεχος (εις διπλούν)
- 4 είδη κρέατος πουλερικών:
 - Κρέας κοτόπουλου χωρίς δέρμα
 - Στήθος κοτόπουλου με δέρμα
 - Δέρμα από κρέας γαλοπούλας χωρίς δέρμα
 - Στήθος γαλοπούλας με δέρμα
 - Δέρμα από 6 διαφορετικά δείγματα από κάθε τύπο κρέατος πουλερικού
- Για κάθε συνδυασμό «υγρή» ή «ξηρή» ομαδοποίηση
- Έλεγχος στην υπάρχουσα μικροχλωρίδα του κρέατος (Συνολικός Αριθμός Αεροβίων και *Enterobacteriaceae*)





Εξεταζόμενα στελέχη

- *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076
- *Salmonella* Enteritidis από πτηνά
- *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028
- *Salmonella* Typhimurium από πτηνά
- MonoSTM 4,5,12:i:- of EURL-*Salmonella* typing study 2010
- MonoSTM 4,5,12:i:- από τη συλλογή στελεχών του τμήματος οροτυποποίησης





Στελέχη που έχουν υποστεί καταπόνηση

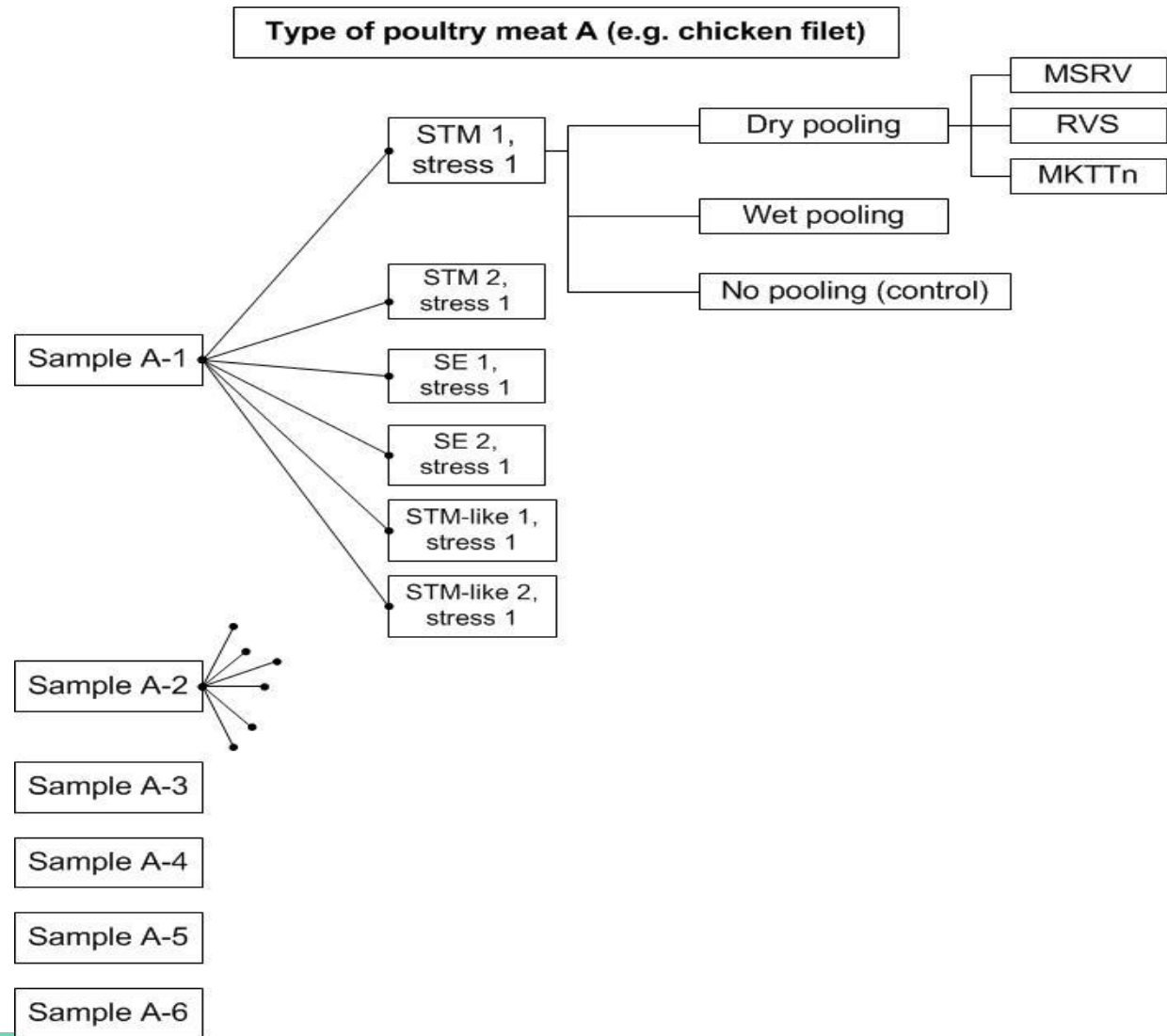
Εφαρμογή του πρωτοκόλλου Annex D του προσχεδίου ISO 16140-2 για στελέχη που έχουν υποστεί στρες:

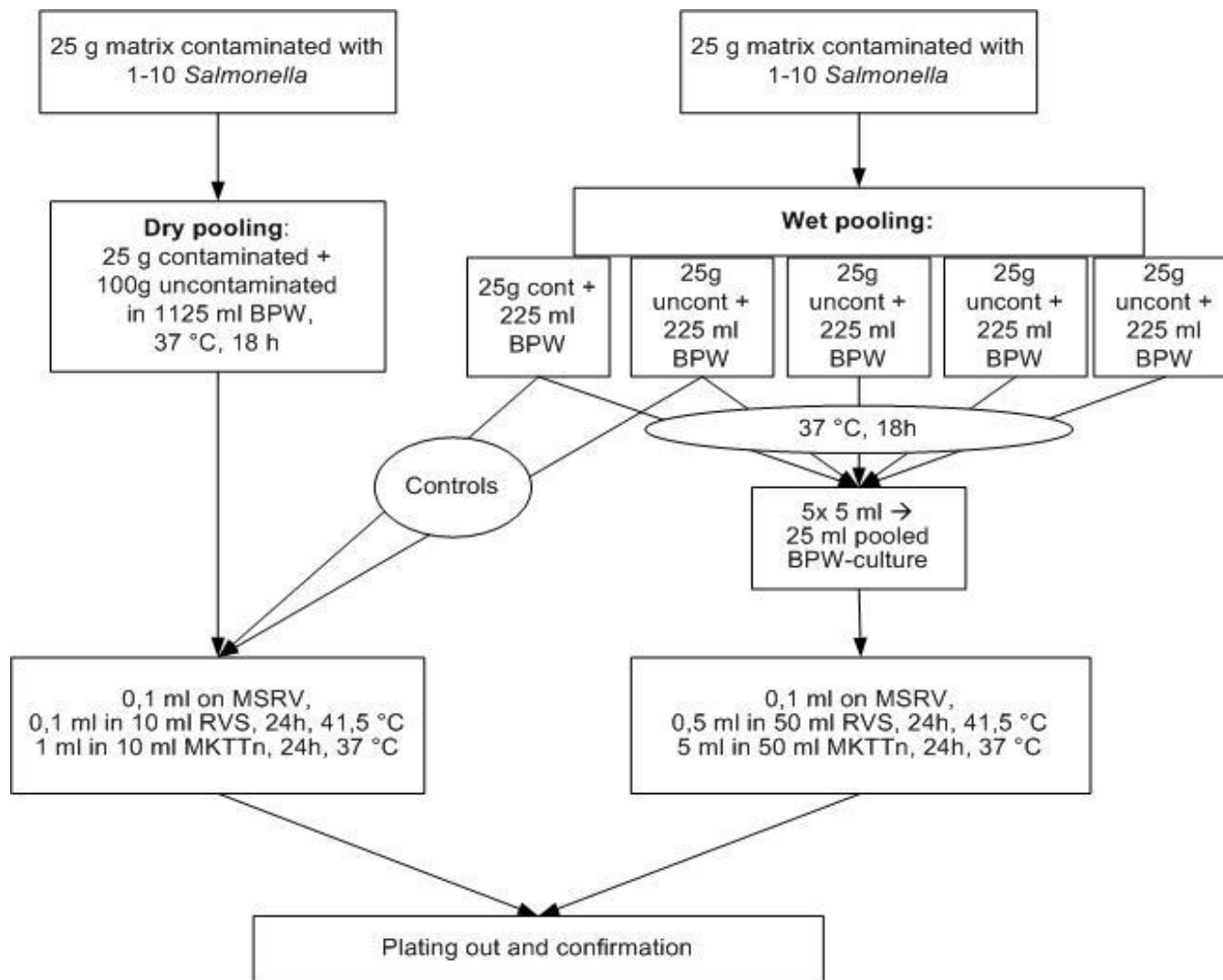
- Καλλιέργεια των στελεχών - στόχων (e.g. 37 C, 18h σε BPW);
- Διενέργεια αραιώσεων
- Εφαρμογή του πρωτοκόλλου «καταπόνησης» π.χ.: 15 min 50 C, 72h -20 C, 1 μέχρι κάποιες βδ. στους 4 C;
- Μέτρηση της «καταπόνησης»: καταμέτρηση των καλλιεργειών σε εκλεκτικά και μη υποστρώματα (π.χ. XLD και NA); «καταπόνηση» εάν διαφορά στην καταμέτρηση ($\log NA - \log XLD$) $> 0,5 \log cfu$;
- Προσαρμογή του επιπέδου ανά αραιώση για ενοφθαλμισμό υλικού με 1-10 κύτταρα
- Ενοφθαλμισμός υλικού με πιπέτα, ή ψεκασμό, ακολούθησε ανάμειξη και εξέταση

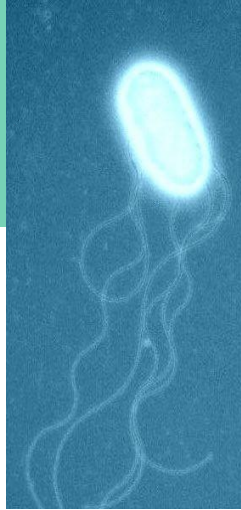


Πειραματικός σχεδιασμός

Σχήμα ανά
τύπο
κρέατος







Αποτελέσματα

Ποσότητα φυσιολογικής χλωρίδας ανά τύπο κρέατος πουλερικών:

	Enterobacteriaceae (cfu/ml)	Συν. αρ. αεροβίων (cfu/ml)
Κρέας πουλερικών χωρίς δέρμα	$<10 - 10^5$	$10^2 - 10^8$
Κρέας πουλερικών με δέρμα	$10 - 10^8$	$10^4 - 10^9$

Η ποσότητα της 'καταπόνησης' διέφερε ανάλογα με το στέλεχος *Salmonella* και το είδος της 'καταπόνησης' που υποβλήθηκαν οι μικροοργανισμοί:

Διαφορά $\log_{NA} - \log_{XLD}$	χαμηλότερο	υψηλότερο
Αποθήκευση +4 C για 4-8 βδ.	0	0,5
Αποθήκευση -20 C για 3μ - 2 βδ.	0	1,3
Θερμότητα +50 C για 15 min	0	1,1



Στατιστική ανάλυση

- Προέκυψαν πολλοί συνδυασμοί για περαιτέρω διερεύνηση:
 - 4 υλικά, 3 ορότυποι, 6 στελέχη, 3 τύποι ' πρόκλησης καταπόνησης, 3 διαφορετικά εκλεκτικά υποστρώματα, 2 είδη ομαδοποίησης και μια μέθοδος ελέγχου (συνολικά 1404 αποτελέσματα)
 - Μόνο 'εργαστηριακά διαχειρίσιμες' μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν για στατιστική σύγκριση (χρήση 'uncorrected' McNemar test):
 - Ξηρή ομαδοποίηση σε σύγκριση με μη ομαδοποιημένο δείγμα control
 - Υγρή ομαδοποίηση σε σύγκριση με μη ομαδοποιημένο δείγμα control

Διεξήχθη σε:

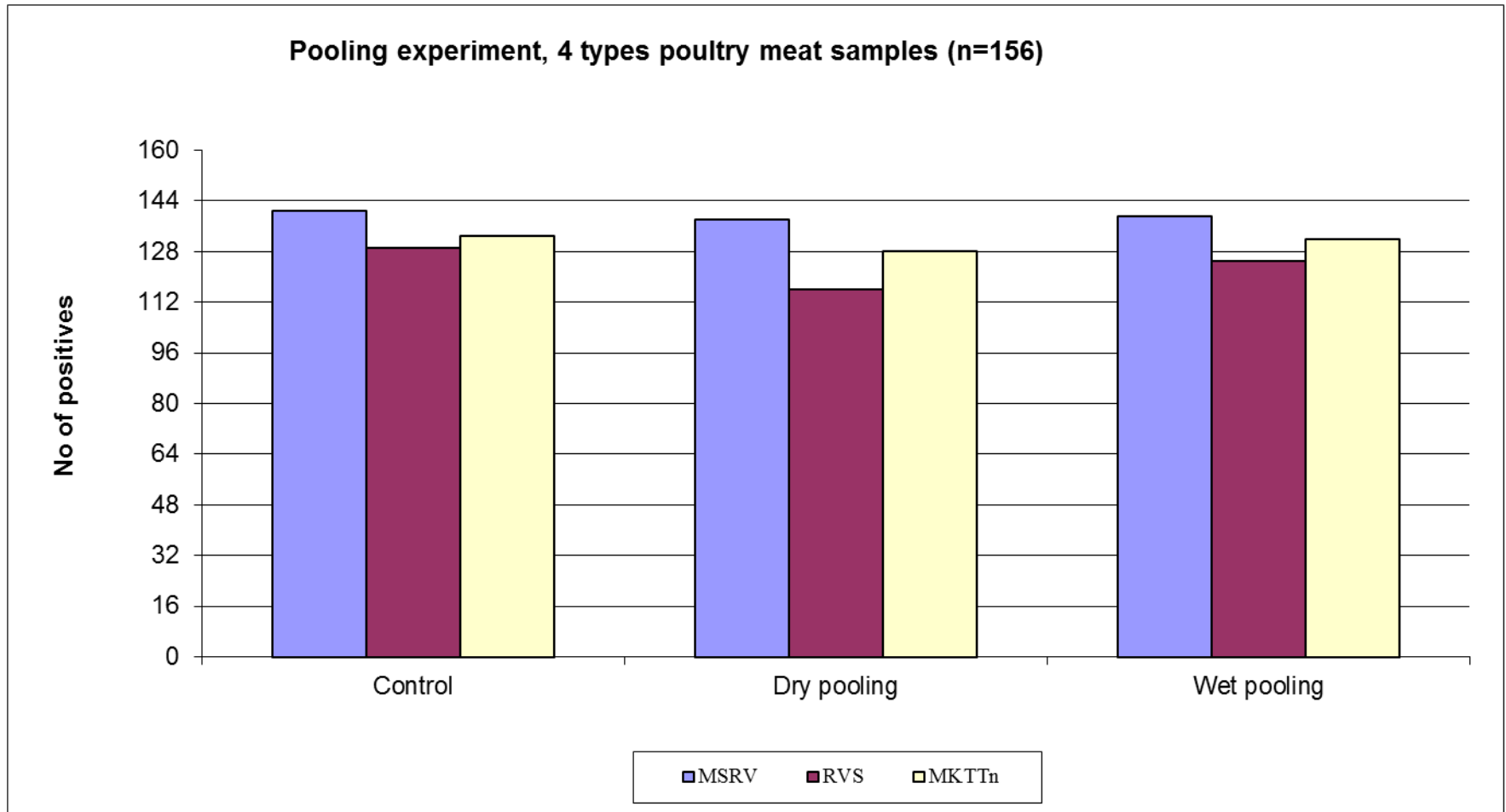
Όλους τους συνδυασμούς; για εκλεκτικό υπόστρωμα, ή για Κάθε υπόστρωμα που υποδεικνύει η ISO (RVS & MKTTn x MSRV);

Για κάθε τύπο κρέατος πουλερικού (με ή χωρίς δέρμα)





Αποτελέσματα ομαδοποίησης- 4 είδη κρέατος πουλερικών





Αποτελέσματα Στατιστικής ανάλυσης

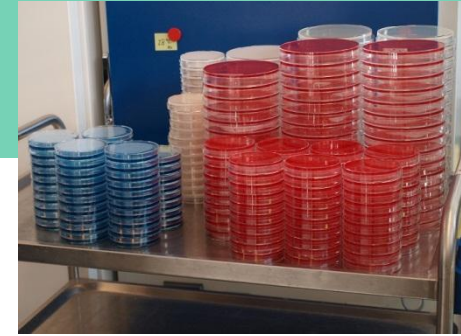
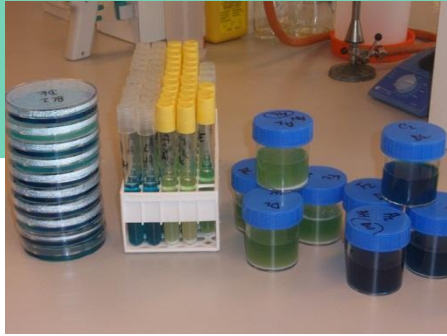
Σημαντικές διαφορές για:

- Ξηρή ομαδοποίηση όλοι οι συνδυασμοί x control (81,6% θετ. x 86,1%)
- Ξηρή ομαδοποίηση και χρήση RVS x control (74,4% θετ. x 82,7%)
- Ξηρή ομαδοποίηση κρέας πουλερικών με δέρμα x control (71,4% pos x 79,4%)
- Ξηρή ομαδοποίηση με χρήση MSRV x ξηρή ομαδοποίηση με χρήση RVS & MKTTn (88,5% θετ. x 83,3%)
- Υγρή ομαδοποίηση με χρήση MSRV x υγρή ομαδοποίηση με χρήση RVS & MKTTn (89,1% θετ. x 85,3%)

Καμία άλλη στατιστικώς σημαντική διαφορά σε άλλους συνδυασμούς

Αριθμός θετικών δειγμάτων μετά την υγρή ομαδοποίηση ελαφρά χαμηλότερος σε σύγκριση με control (84% θετ. x 86,1%), αλλά όχι σημαντική.

Υγρή ομαδοποίηση και χρήση MSRV έδωσαν σχεδόν τα ίδια αποτελέσματα με control (89,1% θετ. x 90%)



Συμπεράσματα

- Η ομαδοποίηση του κρέατος πουλερικών επηρεάζει την ανίχνευση *Salmonella*!
- Η επίδραση εξαρτάται από τον τύπο της ομαδοποίησης, την ποσότητα της υπάρχουσας μικροχλωρίδας και το εκλεκτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται
- Η ξηρή ομαδοποίηση κρέατος πουλερικών έχει ως αποτέλεσμα μια σημαντική αύξηση των ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων *Salmonella* σε σύγκριση με τα μη-ομαδοποιημένα
- Καμία σημαντική διαφορά στην ανίχνευση *Salmonella* δεν βρέθηκε μεταξύ της υγρής ομαδοποίησης και μη ομαδοποιημένων δειγμάτων κρέατος πουλερικών
- Ο εκλεκτικός εμπλουτισμός σε MSRV είχε ως αποτέλεσμα τους υψηλότερους αριθμούς θετικών σε *Salmonella* δειγμάτων κρέατος πουλερικών (ομαδοποιημένα και μη-ομαδοποιημένα)

