

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

**«Μεταφορά και παράμετροι κινητικής του παθογόνου
μικροοργανισμού *Salmonella* spp. μετά από προσαρμογή σε
διαφορετικά υπολείμματα τροφίμων και απορρυπαντικών πάνω σε
οικιακά σκεύη συντήρησης »**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΦΥΤΡΟΣ ΑΓΓΕΛΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2012



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΟΤΩΝ

ΦΥΤΡΟΣ ΑΓΓΕΛΟΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«Μεταφορά και παράμετροι κινητικής του παθογόνου
μικροοργανισμού *Salmonella* spp. μετά από προσαρμογή σε
διαφορετικά υπολείμματα τροφίμων και απορρυπαντικών πάνω σε
οικιακά σκεύη συντήρησης»**

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης (Επίκουρος Καθηγητής)

Εξεταστική – Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σκανδάμης Παναγιώτης (Επίκουρος Καθηγητής)

Κωμαίτης Μιχαήλ (Καθηγητής)

Γιαννιώτης Σταυριανός (Καθηγητής)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Salmonella</i>	11
1.1.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία.....	11
1.1.2 Οικογένεια <i>Enterobacteriaceae</i>	12
1.1.3 Μελέτη του γένους <i>Salmonella</i>	13
1.1.4 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες.....	15
1.1.5 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	16
1.1.6 Συσχετισμός με τα τρόφιμα.....	21
1.1.7 Επιδημιολογία.....	24
1.1.8 Επιβίωση του μικροοργανισμού <i>Salmonella spp.</i> υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης.....	26
1.2 Υγιεινή κουζίνας.....	27
1.2.1 Εισαγωγή.....	27
1.2.2 Υγιεινή οικίας.....	29
1.2.3 Παρουσία των παθογόνων μικροοργανισμών στην οικία και τις οικιακές κουζίνες.....	31
1.2.4 Διασταυρούμενη επιμόλυνση του παθογόνου στην οικία.....	34
1.2.5 Σχηματισμός βιοϋμενίου (biofilm) και επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα.....	38
1.2.6 Μικροβιολογική ποιότητα των περισσευμάτων τροφών.....	39
1.2.7 Η επίδραση του καθαρισμού και της απολύμανσης στην υγιεινή της κουζίνας.....	40
1.3 Συνήθειες σχετικά με την συντήρηση προμαγειρευμένων τροφίμων και το πλύσιμο σκευών κουζίνας.....	46
1.3.1 Μέσα πλύσιμου σκευών κουζίνας και μικροβιολογική μόλυνση.....	46
1.3.2 Χειρισμός προμαγειρευμένων τροφίμων.....	50

1.4	Μεταφορά των παθογόνων μικροοργανισμών από τις επιφάνειες.....	55
1.4.1	Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	56
1.4.2	Ενδογενείς παράγοντες.....	61
1.5	Παράμετροι κινητικής των βακτηρίων.....	62
1.6	Σκοπός της μελέτης.....	68
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	70
2.1	Αναλώσιμα υλικά.....	71
2.1.1	Θρεπτικά υποστρώματα.....	71
2.2	Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	72
2.3	Μικροβιακά στελέχη.....	74
2.4	Πειραματική διαδικασία.....	74
2.4.1	Ανανέωση των μικροοργανισμών.....	76
2.4.2	Προετοιμασία και εμβολιασμός των Τροφικών Υπολειμμάτων.....	77
2.4.3	Εμβολιασμός των επιφανειών με τα ενοφθαλμισμένα ΤΥ.....	79
2.4.4	Μέθοδοι ανάκτησης κυττάρων <i>Salmonella</i> από τις επιφάνειες.....	81
2.4.5	Ετοιμασία προ-μαγειρευμένων τροφίμων.....	82
2.4.6	Άμεση επαφή των τροφίμων με τις επιφάνειες.....	83
2.4.7	Μελέτη των παραμέτρων κινητικής με την συσκευή Bioscreen.....	85
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	91
3.1	Υπολείμματα τροφίμων.....	92
3.2	Ανάκτηση από τις επιφάνειες.....	93
3.3	Επίδραση διάφορων παραγόντων στην μεταφορά κυττάρων από την άμεση επαφή επιφάνειας-τροφίμου.....	95
3.3.1	Επίδραση από το είδος τροφίμου.....	95
3.3.2	Επίδραση από το είδος της επιφάνειας.....	99
3.3.3	Επίδραση από την προσθήκη ή όχι απορρυπαντικού.....	100
3.3.4	Επίδραση από το είδος των τροφικών υπολειμμάτων.....	101
3.4	Ρυθμός ανάπτυξης και χρόνος προσαρμογής του βακτηρίου <i>Salmonella</i> και η επίδραση διαφορετικών παραγόντων.....	103

3.4.1	Ρυθμός ανάπτυξης και χρόνος προσαρμογής για τα 5 μελετηθέντα στελέχη <i>Salmonella</i> spp.....	103
3.4.2	Ρυθμός ανάπτυξης.....	105
3.4.3	Χρόνος προσαρμογής.....	107
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	112
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	115

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι οικιακοί σπόγγοι μπορεί να αποτελέσουν πιθανό μέσο μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών σε περιέκτες συντήρησης τροφίμων και μετέπειτα σε Έτοιμα Προς Κατανάλωση ή προ-μαγειρεμένα τρόφιμα. Κατά την πορεία αυτή, οι μικροοργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με πληθώρα στρεσογόνων συνθηκών, όπως π.χ. παρουσία απορρυπαντικού, αφυδάτωση λόγω εξάτμισης νερού, οξέα από τα υπολείμματα τροφών κτλ., οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την επιβίωση/ανάκτηση ή τις παραμέτρους κινητικής του παθογόνου. Στόχος της μελέτης ήταν η επίδραση της παραμονής του παθογόνου *Salmonella* sp. στην επιφάνεια σκευών συντήρησης τροφίμων παρουσία διαφορετικών υπολειμμάτων τροφών (α) στην μεταφορά του παθογόνου σε προ-μαγειρεμένα γεύματα, και (β) στις παραμέτρους κινητικής του μικροοργανισμού, όταν αυτός εκτεθεί σε συνθήκες ήπιας οξύτητας και αλατότητας. Πέντε υπολείμματα τροφίμων [TY; βόειος κιμάς (BK), μαρούλι (M), μαγιονέζα (ΜΓ), BK+M, BK+M+ΜΓ], με (+) ή χωρίς (-) την παρουσία απορρυπαντικού (1% v/v), ενοφθαλμίστηκαν με μίγμα 5 στελεχών *Salmonella* sp. και συντηρήθηκαν στους 25°C για 24 ώρες. Ακολούθησε ενοφθαλμισμός τριών διαφορετικών επιφανειών (πλαστικό, γυαλί, μέταλλο) με κάθε ένα από τα TY και νέα συντήρηση στις ίδιες συνθήκες (25°C / 24ώρες). Κάθε ενοφθαλμισμένη επιφάνεια τοποθετήθηκε υπό σταθερό βάρος (50 g) πάνω από τρία προ-μαγειρεμένα τρόφιμα (μπιφτέκια, λαζάνια με κόκκινη σάλτσα και σάλτσα ντομάτας), με σκοπό τον προσδιορισμό της μεταφοράς του παθογόνου σε τρόφιμα διαφορετικής υφής. Οι παράμετροι κινητικής (χρόνος προσαρμογής, μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης) του παθογόνου που ανακτήθηκε από τις επιφάνειες (με την μέθοδο swab) προσδιορίστηκαν σε TSB με pH 5.5 και 2% NaCl, συσχετίζοντας διαφορετικά επίπεδα αρχικών πληθυσμών με τον χρόνο επίτευξης συγκεκριμένης οπτικής πυκνότητας (Time to Detection). Η έκθεση του παθογόνου σε MRD (control) ή Meat (3.7-5.9 log CFU/g) χωρίς την παρουσία απορρυπαντικού, ευνόησε την μεταφορά του στα προ-μαγειρεμένα γεύματα, σε σύγκριση με άλλα TY (<0.5-3.6 log CFU/g). Όσον αφορά στην επίδραση του είδους του προ-μαγειρεμένου γεύματος στην μεταφορά του παθογόνου, υψηλότεροι πληθυσμοί μεταφέρθηκαν στα λαζάνια (1.6 – 3.6 log CFU/g), σε σύγκριση με τα μπιφτέκια (0.4-1.4 log CFU/g) ή την σάλτσα ντομάτας (0.5-2.2 log CFU/g). Ο ρυθμός αύξησης του παθογόνου δεν επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος του TY ή της επιφάνειας. Αντίθετα, παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στο χρόνο

προσαρμογής του παθογόνου χωρίς να προηγηθεί έκθεσή του σε κάποιο ΤΥ ή επιφάνεια (6.23 ώρες), σε σχέση με τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε τέτοιες συνθήκες (0.17 – 3.65 ώρες, ανάλογα με το είδος του υπολείμματος). Εξαίρεση αποτελούν τα τροφικά υπολείμματα από μαρούλι (M), του οποίου ο χρόνος προσαρμογής κυμαίνεται σε ίδια επίπεδα με το control (3.02 - 7.90 ώρες). Τα αποτελέσματα μπορούν να βοηθήσουν στην εκτίμηση κινδύνων που προέρχονται από μη αναμενόμενες πηγές μόλυνσης εντός του οικιακού περιβάλλοντος, π.χ. σπόγγοι, καθώς επίσης να συμβάλλουν στην ποσοτικοποίηση του κινδύνου μικροβιακής μεταφοράς από οικιακές επιφάνειες σε έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα.

Λέξεις ευρετηρίασης: Salmonella, σκευή συντήρησης, απορρυπαντικά, μεταφορά επιμόλυνσης, παράμετροι κινητικής

ABSTRACT

Stresses encountered by pathogens during passage from foods to sponges and then to food containers include exposure to detergents, starvation on container surface, acids in food residues, etc. These may affect the survival/recovery and the growth dynamics of pathogens and hence, impact the risk of foodborne diseases. We aimed to evaluate the effect of the habituation of *Salmonella* sp. to various food residues on the surface of food containers on: (i) the transferability of the pathogen to precooked meals and (ii) the growth parameters of the pathogen detached from the surfaces and subsequently exposed to a food model. Five food residues (FR), namely ground beef (GB), lettuce (L), mayonnaise (M), GB+L, GB+L+M, and a control (MRD) with (+) or without (-) 1% detergent, were inoculated with a 5-strain composite of *S. Typhimurium* (2 strains) *S. Agona*, *S. Reading* and *S. Enteritidis* and stored at 25°C for 24h. Plastic, metal and glass coupons were spot-inoculated with each FR and stored for another 24 h at 25°C. Each coupon was placed under constant pressure (50g) above three pre-cooked meals (beef patties, lasagna, tomato sauce) in order to evaluate the transfer of the pathogen to a solid, semi-solid or liquid food type. The growth parameters (μ_{\max} , t_{λ}) of the cells recovered from each surface were also determined in TSB of pH 5.5 and 2% NaCl. Populations of *Salmonella* transferred to the precooked meals were higher after habituation in MRD(-) or GB(-,+) (3.7-5.9 log CFU/g) compared to other types of FR (<0.5-3.6 log CFU/g). In the presence of MRD(+) and GB+L(-,+), higher populations were recovered from lasagna (1.6-3.6 log CFU/g) compared to beef patties (0.5-1.4 log CFU/g) or tomato sauce (0.5-2.2 log CFU/g). Broth-based experiments showed that the μ_{\max} of *Salmonella* (0.27-0.45 h⁻¹) was not significantly affected by the stresses encountered on coupons. In contrast, non-habituated cells showed longer lag time (6.23 h) compared with cells which were exposed to different FR on surfaces (0.17 – 3.65 h). The exception is the FR from lettuce (L), whose lag time varies at the same levels of control (3.02 - 7.90 hours). Results may assist in ranking the risk of pathogen growth after habituation in different contamination sources and contribute with quantitative risk assessment data for the bacterial transfer from surfaces to Ready-to-Eat meals.

Key words: *Salmonella*, food containers, detergents, growth kinetics, transfer contamination.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης και Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, για την ανάθεση του θέματος και για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, και κυρίως για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και εν γένει συμβολή του καθ' όλη τη διάρκεια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών. Θα ήθελα επίσης πραγματικά να ευχαριστήσω τον Δρ. Μανιό Σταύρο, μέλος του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη βοήθεια και την ανεκτίμητη συνεισφορά του στην εκπόνηση αυτής της μελέτης, είτε σε επίπεδο διεξαγωγής των πειραμάτων είτε σε επίπεδο συγγραφής της, ο οποίος ήταν ανά πάσα στιγμή πρόθυμος να προσφέρει τις γνώσεις του και την βοήθεια του. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και τη δημιουργία ενός ευχάριστου περιβάλλοντος στον εργαστηριακό χώρο αλλά και όλους όσους έμμεσα ή άμεσα συνεισέφεραν στην ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες τόσο στους γονείς μου όσο και στους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξή τους μέχρι την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ *SALMONELLA* SPP.

1.1.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία

Έχουν προκύψει 16 εκατομμύρια ετήσιες περιπτώσεις τυφοειδούς πυρετού, 1,3 δισεκατομμύρια περιπτώσεις γαστρεντερίτιδας και 3 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως εξαιτίας του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* (Bhunia, 2008). Εν συντομία, είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο, Gram-αρνητικό μαστιγοφόρο ραβδοειδές βακτήριο, του οποίου το μέγεθος είναι 2-3 x 0.4-0.6 μm (Yousef and Carlstrom, 2003; Montville and Matthews, 2008).

Η επιδημιολογική ταξινόμηση της σαλμονέλας είναι βασισμένη στην προτίμηση του ξενιστή. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει ορότυπους με περιορισμένες επιλογές ξενιστή (host-restricted) και προσβάλλουν μόνο τον άνθρωπο, όπως ο *S. Typhi*. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει ορότυπους που προσαρμόζονται στον ξενιστή (host-adapted) και συνδέονται με ένα είδος ξενιστή, αλλά μπορεί να προκαλέσει νόσο και σε ορότυπους άλλων ξενιστών, όπως ο *S. pullorum* στα πουλερικά. Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τους υπόλοιπους ορότυπους. Συνήθως, οι παθογόνοι *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium* και *Salmonella Heidelberg* είναι οι τρεις πιο συχνοί ορότυποι που ανακτώνται από ανθρώπους κάθε χρόνο (Gray and Fedorka-Cray, 2002; Boyen *et al.*, 2008).

Τα περισσότερα στελέχη του είδους *Salmonella spp.* θεωρούνται ως ανθρώπινα παθογόνα, αν και διαφέρουν στα χαρακτηριστικά και τη δριμύτητα της ασθένειας που προκαλούν. Ο τυφοειδής πυρετός είναι το πιο δριμύ αλλά και το πρώτο χαρακτηριστικό της μόλυνσης από σαλμονέλα που περιγράφηκε αξιόπιστα. Αυτό οφείλεται στον Γάλλο παθολόγο Bretonneau και στη μελέτη του το 1829 για τον τυφοειδή πυρετό. Το 1856, ο Άγγλος παθολόγος William Budd κατέληξε στο συμπέρασμα ότι κάθε περίπτωση τυφοειδούς προσβολής συνδέεται επιδημιολογικά με μια προηγούμενη περίπτωση και ότι μια συγκεκριμένη τοξίνη αποβάλλεται με τα περιττώματα των ασθενών.

Οι Salmon και Smith το 1885 απομόνωσαν το μικροοργανισμό *Salmonella enterica* var. Choleraesuis από άρρωστους χοίρους με χολέρα (μια ασθένεια που τώρα είναι γνωστό ότι έχει ιογενή προέλευση) και μια πληθώρα άλλων στελεχών που προκαλούσαν τροφιμογενείς ασθένειες και ζωικές προσβολές. Το γένος *Salmonella* spp. «ανακαλύφθηκε» τελικά το 1900 από τον Lignieres και ονομάστηκε έτσι προς τιμήν του αμερικανού παθολόγου κτηνίατρου D.E. Salmon, που ήταν ο επικεφαλής του προγράμματος του USDA το 1885 που περιέγραψε το μικροοργανισμό *Salmonella enterica* var. Choleraesuis. Η σαλμονέλα έχει πλέον καθιερωθεί ως μια από τις σημαντικότερες αιτίες τροφιμογενούς ασθένειας παγκοσμίως.

1.1.2 Οικογένεια *Enterobacteriaceae*

Η οικογένεια αυτή είναι η μεγαλύτερη ομάδα από τα μη φωτοσυνθετικά αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Χαρακτηριστικά τους είναι το ραβδοειδές ευθύγραμμο ή καμπυλοειδές σχήμα, έχουν διαστάσεις 0,3-1,0 x 1,0-6,0 μm. Ορισμένα είναι ανίκανα για κίνηση ενώ τα περισσότερα κινούνται με μαστίγια που μπορεί να είναι περίτριχα, πολικά ή μεικτού τύπου (πολικά και περίτριχα). Σε αναερόβιες συνθήκες η ενέργεια προέρχεται από τη ζύμωση σακχάρων ενώ σε αερόβιες συνθήκες, για την οξειδωτική αναπνοή, χρησιμοποιείται μεγάλη ποικιλία οργανικών ενώσεων (οργανικά οξέα, αμινοξέα, υδατάνθρακες). Ο πιο συνηθισμένος τύπος ζύμωσης στα εντεροβακτήρια είναι η ζύμωση με την οποία σχηματίζονται τα οξέα γαλακτικό, οξικό, ηλεκτρικό και μυρμηκικό (ή CO₂ και H₂) καθώς και αιθυλική αλκοόλη (mixed acid fermentation), (Holt, 1974). Ο σχηματισμός ποσοτήτων αερίων σαν αποτέλεσμα της ζύμωσης του σακχάρου είναι ιδιότητα χρήσιμη για την ταυτοποίηση των διάφορων μελών των εντεροβακτηρίων: το γένος *Escherichia* που συσσωρεύει αέρια, διαχωρίζεται από τα παθογόνα του γένους *Shigella* και από το είδος *Salmonella Typhi* τα οποία ζυμώνουν τα σάκχαρα χωρίς να δημιουργούν αέρια. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται καλά στους 37°C. Ωστόσο πολλά είδη αναπτύσσονται καλύτερα στους 25-30°C και είναι συχνά περισσότερο ενεργά μεταβολικά σε αυτές τις θερμοκρασίες. Τα εντεροβακτήρια είναι αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και θετικά στην δοκιμή της καταλάσης, εκτός από τη *Yersinia dysenteriae* και είδη του γένους *Xenorhabdus* όπως το *X. luminescens*.

Η κατανομή τους ποικίλει σε μεγάλο βαθμό. Βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, τα φυτά και τα δέντρα και στα ζώα από τα σκουλήκια και τα έντομα μέχρι και τον άνθρωπο (Vassos, 2004). Με βάση κριτήρια βιοχημικά (αντίδραση καταλάσης και οξειδάσης), μορφολογικά (τύπος μαστιγίων) και γενετικά (ομόλογες αλληλουχίες βάσεων), η οικογένεια *Enterobacteriaceae* περιλαμβάνει τα παρακάτω γένη (Holt, 1974): *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Habnia*, *Serratia*, *Erwinia*, *Arsenophonus*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Ewingella*, *Kluuyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pragia*, *Prividencia*, *Rahnella*, *Tatumella*, *Yokenella*, *Xenorhabdus*. Ενδιαφέρον για την μικροβιολογία τροφίμων παρουσιάζουν κυρίως τα γένη : *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia* και *Erwinia*.

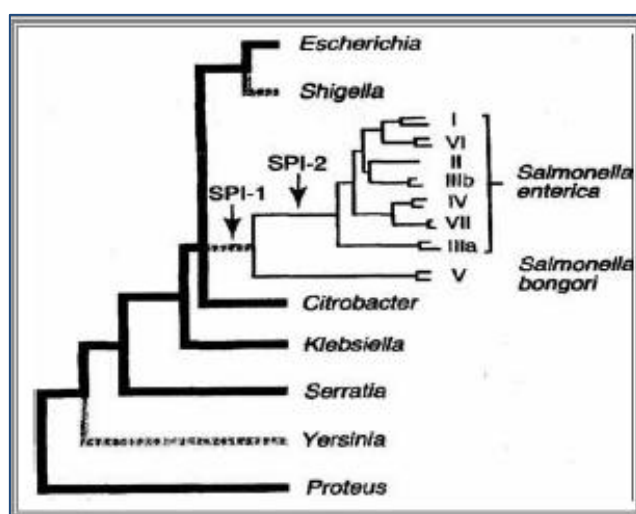
1.1.3 Μελέτη του γένους *Salmonella*

Το γένος *Salmonella* έχει ευρεία εξάπλωση. Ανιχνεύεται στο εντερικό σύστημα των ζώων και του ανθρώπου, στα κόπρανα, στα ούρα, στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Η ονοματολογία των ειδών του γένους *Salmonella* είναι αμφισβητούμενη, δεδομένου ότι η αρχική ταξινόμηση του γένους δεν βασίστηκε στην ομολογία DNA, αλλά τα ονόματα δόθηκαν σύμφωνα με τις κλινικές εκτιμήσεις, π.χ., *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *S. abortus-ovis*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. dublin*, *S. bongor* ή την γεωγραφική θέση που η ασθένεια εμφανίστηκε. Έχουν περιγραφεί πολλοί ορότυποι του γένους *Salmonella*. Το σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο των Kauffman-White έχει αποδειχτεί η πιο χρήσιμη τεχνική για ορισμό διαφοροποιήσεων εντός του γένους. Αυτή η τεχνική περιγράφει τους μικροοργανισμούς βάσει των σωματικών αντιγόνων τους (O) και των αντιγόνων των μαστιγίων (H) αλλά και βάσει των αντιγόνων των καψιδίων (Vi) που διαθέτουν τα στελέχη *S. typhi*, *S. dublin* και σε μερικές περιπτώσεις τα στελέχη *S. paratyphi*. Η τεχνική αυτή διέκρινε 100 διαφορετικούς ορότυπους το έτος 1941. Σήμερα αυτή η ταξινόμηση ανά ορότυπο διακρίνει 2463 ορότυπους (Kaufmann, 1966).

Πίνακας 1		
Είδη σαλμονέλων, υποείδη, ορότυποι, και οι συνηθισμένοι βιότοποί τους ,σχέδιο Kaufmann-White		
Είδη και υποείδη σαλμονέλων	Αριθμός ορότυπων στα υποείδη	Συνηθισμένος βιότοπος
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1454	Θερμόαιμα ζώα
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
<i>S. bongori</i> (V)	20	Ψυχρόαιμα ζώα και το περιβάλλον
Total	2463	

Πίνακας 1.1 Το σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο των Kauffman-White.

Τελικά διαπιστώθηκε ότι όλοι οι ορότυποι του γένους *Salmonella* αποτελούν μια ενιαία ομάδα υβριδοποίησης DNA, δηλαδή ένα ενιαίο είδος που αποτελείται από επτά υποείδη. Για να αποφευχθεί η σύγχυση με τα γνωστά ονόματα των ορότυπων, το είδος *Salmonella enterica* προτάθηκε με τα ακόλουθα ονόματα για τα υποείδη: *enterica* I, *salamae* II, *houtenae* IV, *bongori* B, *diarizonae* IIIb, *arizonae* IIIa, *Indica* V I (Holt, 1974).



Εικόνα 1.1 Φυλογενετικό δέντρο της εξέλιξης των βακτηριακών ειδών

1.1.4 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες

Στο γένος *Salmonella* ανήκουν αρνητικά κατά Gram βακτήρια, κινητά με περίτριχες βλεφαρίδες, αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. Εξαιρέση αποτελούν οι *S. typhi*, *S. paratyphi* και *S. dublin*, που έχουν ειδικό ελυτροειδές περίβλημα και οι *S. gallinarum*, *S. pullorum*, που είναι ακίνητα. Είναι χημειοαυτότροφα και έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν την τροφή τους, τόσο με την αναπνοή όσο και με τη ζύμωση.

Οι περισσότεροι ορότυποι *Salmonella* παρουσιάζουν ανάπτυξη σε θερμοκρασίες ακριβώς από 5° C μέχρι 47° C, με βέλτιστη τιμή τους 35 με 37° C, αλλά μερικοί μπορούν να αναπτυχθούν και σε χαμηλές θερμοκρασίες από 2 έως 4 ° C αλλά και σε υψηλές όπως 54 ° C (Gray and Fedorka-Cray, 2002) . Οι σαλμονέλες είναι θερμοευαίσθητες και καταστρέφονται εύκολα από τις θερμοκρασίες παστερίωσης (70 ° C και πάνω). Απαιτούν υψηλή δραστηριότητα νερού (a_w) μεταξύ 0.99 και 0.94 (καθαρό νερό, $a_w=1$), αλλά μπορούν να επιβιώσουν και σε $a_w < 0.2$ όπως στα ξηρά τρόφιμα. Το στέλεχος *S. Senftenberg 775W* είναι ο πιο ανθεκτικός στη θερμότητα ορότυπος σε υψηλές τιμές a_w και έχει D_{72} στο γάλα 0.09 min. Το ελάχιστο pH για την ανάπτυξη ποικίλλει με το όξινο να είναι στο 5.4 (ρυθμισμένο με οξικό οξύ) και σε 4.05 (ρυθμισμένο με υδροχλωρικό και κιτρικό οξύ). Η βέλτιστη ανάπτυξη παρατηρείται γύρω σε pH 7. Πλήρης παρεμπόδιση της ανάπτυξης πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες <7°C, pH <3.8 ή δραστηριότητα νερού <0.94 (Hanes, 2003; Bhunia, 2008). Η σύγκριση των χαρακτηριστικών των ειδών *Salmonella* παρουσιάζεται στον πίνακα 1.2.

Η D- γλυκόζη και άλλοι υδρογονάνθρακες καταβολίζονται με τη παραγωγή οξέος και συχνά παράγωγη αερίου. Είναι αρνητικά στη δοκιμή της οξειδάσης και θετικά στην δοκιμή της καταλάσης, αρνητικά στις δοκιμές της ινδόλης και τη Voges-Proskauer και θετικά στις δοκιμές ερυθρού του μεθυλίου και της χρησιμοποίησης των κιτρικών αλάτων του Simmon (Holt, 1974). Παράγουν H₂S και δεν υδrolύουν την ουρία. Οι υδατάνθρακες που συνήθως ζυμώνονται είναι οι εξής:

- L- αραβινόζη
- μαλτόζη
- D-μανιτόλη

- D-μανόζη
- L-ραμνόζη
- D-σορβιτόλη
- D-ξυλόζη
- Τρεχαλόζη.

Οι υδατάνθρακες αυτοί φέρουν σημαντικά αντιγόνα που είναι συστατικά του κυττάρου και διακρίνονται στα σωματικά αντιγόνα (αντιγόνα O), βλεφαριδικά αντιγόνα (αντιγόνα H) και αντιγόνα κάψας (αντιγόνα K).

➤ Σωματικά αντιγόνα (αντιγόνα O). Είναι λιποπολυσακχαρίτες και αποτελούν συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Τα αντιγόνα O είναι ανθεκτικά (2 ½ ώρες σε 100°C) και δεν καταστρέφονται από την αλκοόλη και τα οξέα. Αποτελούνται από διάφορα αντιγονικά συστατικά που χαρακτηρίζονται με αραβικούς αριθμούς.

➤ Βλεφαριδικά αντιγόνα (αντιγόνα H). Είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσεως, ευαίσθητες στη θερμότητα, στην αλκοόλη και στα οξέα. Τα βλεφαριδικά αντιγόνα αποτελούνται από περισσότερα αντιγονικά συστατικά. Οι διάφοροι ορότυποι του γένους *Salmonella* έχουν διαφορετικό συνδυασμό αντιγονικών συστατικών, τα οποία σύμφωνα με το σχήμα Kauffmann-White χωρίζονται σε δύο είδη που ονομάζονται φάση 1 (ειδική φάση) και φάση 2 (μη ειδική φάση). Ένας ορότυπος σαλμονέλας είναι δυνατό να έχει αντιγόνα μόνο της μίας φάσης, όπως η *S. enteritidis*, ή να έχει αντιγόνα και των δύο φάσεων, όπως η *S. typhimurium* και η *S. cholerae-suis*. Οι *S. gallinarum* και *S. pullorum*, στερούνται βλεφαρίδων, επομένως δεν έχουν βλεφαριδικά αντιγόνα.

➤ Αντιγόνα κάψας (αντιγόνα K). Τα αντιγόνα αυτά παρατηρούνται μόνο στους παθογόνους για τον άνθρωπο ορότυπους *S. typhi* και *S. paratyphi*. Είναι αντιγόνα του βακτηριδιακού ελύτρου, πολυσακχαριδικής φύσεως. Εμποδίζουν τον προσδιορισμό του αντιγόνου O, επειδή περιβάλλουν το κυτταρικό τοίχωμα. Για το λόγο αυτό πριν από την ταυτοποίηση του αντιγόνου O πρέπει να προηγηθεί καταστροφή των αντιγόνων της κάψας με κατάλληλο τρόπο. Από τα περισσότερα γνωστά αντιγόνα του ελύτρου, είναι το αντιγόνο Vi (ονομασία που προέρχεται από τη λέξη Virulent =λοιμογόνος). Καταστρέφεται υπό την επίδραση της φαινόλης όταν θερμανθεί στους 60°C για μία ώρα. Τα είδη του γένους *Salmonella* που έχουν το αντιγόνο Vi θεωρούνται περισσότερο λοιμογόνα (Moise, 1978). Στο γένος *Salmonella* η λεπτομερής ανάλυση των αντιγόνων O και H είχε σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση

πολλών εκατοντάδων διαφορετικών ορότυπων. Η αντιγονική αυτή ταυτοποίηση αν και δεν έχει μεγάλη ταξινομική αξία είναι σημαντική από επιδημιολογική άποψη. Ο ορότυπος ενός παθογόνου στελέχους *Salmonella*, αποτελεί δείκτη αναγνώρισης του και έτσι γίνεται δυνατή η παρακολούθηση και ταυτοποίηση του στελέχους σε περιπτώσεις μαζικών τροφικών δηλητηριάσεων.

Τα στελέχη σαλμονέλας επίσης ταξινομούνται σε διάφορους τύπους με βάση την ευαισθησία τους στους βακτηριοφάγους.

Η σαλμονέλα είναι ανθεκτικός μικροοργανισμός και επιζεί ακόμη και όταν στερείται των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για το μεταβολισμό της. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανθεκτικότητά τους σε ορισμένες χρωστικές και χημικές ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων. Αναπτύσσονται σε pH 4-9 και σε άλμη πυκνότητας μέχρι 7 έως 8% NaCl. Όπως σε όλα τα Gram-αρνητικά βακτήρια, το κυτταρικό τοίχωμα τους περιέχει λιποπολυσακχαρίτες. Με τη λύση των κυττάρων οι λιποπολυσακχαρίτες ελευθερώνονται και ενεργούν ως ενδοτοξίνες. Η σαλμονέλα δεν παράγει εξωτοξίνες και ο μηχανισμός παθογένειας της φαίνεται ότι έχει σχέση με το O αντιγόνο της που δρα ως ενδοτοξίνη (Holt, 2000).



Εικόνα 1.2 Αποικίες *Salmonella* σε υπόστρωμα XLD



Εικόνα 1.3 Μικρογραφία αναπαράστασης του βακτηρίου σαλμονέλας

Πίνακας 1.2: Σύγκριση των χαρακτηριστικών των ειδών *Salmonella* (Pui *et al.*, 2011).

Characteristics	<i>Salmonella enterica</i> subsp.						<i>Salmonella bongori</i>
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
<i>Classification (roman numeral)</i>	I	II	IIIa	IIIb	IV	VI	V (formerly)
<i>Usual habitat</i>	Warm-blooded animals	Warm-blooded animals	Cold-blooded animals & environment	Cold-blooded animals & environment	Cold-blooded animals & environment	Cold-blooded animals & environment	Cold-blooded animals & environment
<i>Morphological characteristics</i>							
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+ (except pullorum & gallinarum)	+	+	+	+	+	+
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size (width, µm)	0.7-1.5	0.7-1.5	0.7-1.5	0.7-1.5	0.7-1.5	0.7-1.5	0.7-1.5
Size (length, µm)	2-5	2-5	2-5	2-5	2-5	2-5	2-5
<i>Colony morphologies</i>	Black colonies surrounded by a brown to black zone that casts a metallic sheen						
Bismuth sulphite agar	Translucent amber to colourless colonies						
Eosin-methylene blue agar	Blue to blue-green colonies, mostly with black centers (H ₂ S producers)						
Hektoen enteric agar	Colourless colonies on a pink background						
<i>Salmonella-Shigella</i> agar	Black-centered red colonies (H ₂ S producers)						
Xylose lysine desoxycholate agar							
<i>Growth characteristics</i>							
Optimum temperature (°C)	35-37	35-37	35-37	35-37	35-37	35-37	35-37
Optimum pH	6.5-7.5	6.5-7.5	6.5-7.5	6.5-7.5	6.5-7.5	6.5-7.5	6.5-7.5
<i>Biochemical characteristics</i>							
α-glutamyltransferase	d	+	-	+	+	+	+
β-Glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Hydrogen sulfide	+	+	+	+	+	+	+
Indole test	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	-	-	+	+	+	d
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	+
L(+)-tartrate	+	+	-	-	-	-	-
Malonate	+	+	+	+	-	-	-
Methyl red test	+	+	+	+	+	+	+
Murate	+	+	+	+	-	d	+
<i>Ortho</i> -nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside test	-	-	-	+	-	+	d
Phage O1 susceptible	+	+	-	+	-	+	d
Potassium cyanide broth	-	-	-	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	+	+	+	d
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-
Voger-Proskauer test	-	-	-	-	-	-	-

Note: +, more than 90% positive reactions; -, less than 10% positive reactions; d, different reactions given by different serovars

1.1.5 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

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

Εντερίτιδα. Οι γαστρεντερικές μολύνσεις είναι κυρίως συνδεδεμένες με εκείνους τους ορότυπους που εμφανίζονται ευρέως στα ζώα και τους ανθρώπους. Μπορούν να κυμανθούν από πλευράς δριμύτητας από ασυμπτωματική μεταφορά μέχρι διάρροια που είναι και ο πιο κοινός τύπος σαλμονέλωσης. Η περίοδος επώασης για εντερίτιδα

είναι μεταξύ 6 και 48 ωρών. Τα κύρια συμπτώματα του ήπιου πυρετού, της ναυτίας, του εμετού, των κοιλιακών πόνων και της διάρροιας διαρκούν για μερικές ημέρες αλλά σε μερικές περιπτώσεις, μπορούν να εμμείνουν για μια εβδομάδα ή περισσότερο. Η ασθένεια συνήθως περιορίζεται από μόνη της με την πάροδο του χρόνου αλλά μπορεί να καταστεί πιο σοβαρή στις ιδιαίτερα ευαίσθητες ομάδες πληθυσμού, όπως στους πολύ νέους, στους πολύ ηλικιωμένους και στους ήδη ασθενείς. Κατόπιν κατάποσης, ο μικροοργανισμός θα επιζήσει της διέλευσης μέσω του όξινου περιβάλλοντος του στομάχου, θα προσκολληθεί στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου μέσω συνδέσμων ανθεκτικών στη μανόζη. Στη συνέχεια εισάγονται εντός των κυττάρων με μια διαδικασία γνωστή ως ενδοκύττωση μέσω δέκτη (receptor mediated endocytosis). Η ικανότητα της *Salmonella spp.* να εισάγεται σε μη φαγοκυτταρικά κύτταρα προσδίδει ουσιαστική δυναμικότητα στην παθογένειά της. Η κατανόηση της μοριακής βάσης αυτής της διαδικασίας έχει αυξηθεί αρκετά με την ανακάλυψη ότι κωδικοποιείται κατά ένα μεγάλο μέρος από μια περιοχή 35-40 kb του χρωμοσώματος, που περιγράφεται ως περιοχή παθογένειας. Αυτή η περιοχή του DNA κωδικοποιεί ένα σύνθετο σύστημα έκκρισης πρωτεϊνών, γνωστό ως σύστημα έκκρισης τύπου III, που απαιτούνται για την αποστολή σημάτων που αποσυντονίζουν τα κύτταρα του ξενιστή και τελικά οδηγούν στην είσοδο των βακτηριακών κυττάρων. Τέτοια συστήματα υπάρχουν επίσης και σε διάφορους άλλους εντεροπαθογόνους μικροοργανισμούς όπως τα είδη *Shigella*, *Yersinia* και τα εντεροπαθογόνα και εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli*. Η σαλμονέλα που έχει εισαχθεί με ενδοκύττωση περνά μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα διαμέσου ενός συνδεδεμένου στη μεμβράνη χυμοτοπίου, όπου πολλαπλασιάζονται και απελευθερώνονται έπειτα στο μεμβρανώδες βλεννογόνο. Αυτό προκαλεί μια ροή φλεγμονωδών κυττάρων που οδηγούν στην απελευθέρωση προσταγλαδινών που ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση η οποία προκαλεί έκκριση ρευστών στον εντερικό αυλό. Η εικόνα είναι λίγο πιο σύνθετη αν αναλογιστεί κανείς ότι υπάρχουν τουλάχιστον άλλες τέσσερις περιοχές παθογένειας που συμβάλλουν κι αυτές στην όλη παθογένεια του μικροοργανισμού.

Συστηματική νόσος. Οι ορότυποι *Salmonella spp.* που προσαρμόζονται ανάλογα με τον ξενιστή είναι πιο επιθετικοί και τείνουν να προκαλέσουν συστηματικές νόσους στους ξενιστές τους, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα τους που συνδέεται με την ανθεκτικότητά τους στην καταπολέμηση από τα φαγοκύτταρα. Στους ανθρώπους, αυτό ισχύει για τους τυφοειδείς και παρατυφοειδείς βακίλους *S. typhi* και *S.*

Paratyphi A, B, και C, οι οποίοι προκαλούν σηψαιμικές ασθένειες και εντερικό πυρετό. Ο τυφοειδής πυρετός έχει μια περίοδο επώασης από 3 έως 56 ημέρες, αν και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 10 και 20 ημερών. Ο επιτιθέμενος μικροοργανισμός *Salmonella spp.* διαπερνά το εντερικό επιθήλιο και έπειτα μεταφέρεται από τα λεμφικά κύτταρα στους μεσεντερικούς λεμφαδένες. Μετά από τον πολλαπλασιασμό του το παθογόνο στα μακροφάγα, απελευθερώνεται στη ροή του αίματος και διαδίδεται σε ολόκληρο το σώμα. Αφαιρούνται από το αίμα και πάλι με χρήση των μακροφάγων αλλά συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται μέσα σε αυτά κάτι το οποίο έχει ως συνέπεια καταστροφή τελικά των μακροφάγων τα οποία απελευθερώνουν με τη σειρά τους μεγάλους αριθμούς βακτηρίων στη ροή του αίματος προκαλώντας σηψαιμία. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου της ασθένειας, ο μικροοργανισμός φθάνει στη χοληδόχο κύστη όπου πολλαπλασιάζεται στη χολή. Η ροή μολυσμένης χολής επιμολύνει το λεπτό έντερο οπότε και προκαλείται φλεγμονή και έλκος. Ο πυρετός εμμένει με παράλληλη διάρροια κατά την οποία αποβάλλονται μεγάλες ποσότητες βακτηρίων. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις, μπορεί να εμφανιστεί αιμορραγία των ελκών και διάτρηση του εντέρου που οδηγεί σε περιτονίτιδα. Σε ηπιότερες περιπτώσεις, τα έλκη θεραπεύονται και ο πυρετός πέφτει σταδιακά μετά από 4-5 εβδομάδες ανάρρωσης. Η μοριακή και γενετική βάση για την προσκόλληση και εισβολή του βακτηρίου *Salmonella spp.* εντός των κυττάρων των ξενιστών και η εν γένει παθογένειά της είναι και σύνθετη και ξεχωριστή. Τουλάχιστον 60 γονίδια είναι υπεύθυνα για τη λοιμοτοξικότητα του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού (Groisman και Ochman, 1997). Αρκετά από αυτά τα γονίδια εδρεύουν ως οπερόνιο σε ένα μεγάλο πλασμίδιο κοινό για τους περισσότερους οροτύπους *Salmonella spp.* ενώ ακόμη ένας μεγάλος αριθμός βρίσκεται σε διάφορες περιοχές του χρωμοσώματος μέσα σε ζώνες παθογονικότητας (pathogenicity islands). Η ζώνη παθογονικότητας της οποίας η δράση έχει αναλυθεί περισσότερο είναι η SPI-1, μια περιοχή 40 kb που διαθέτει πάνω από 30 γονίδια και κωδικοποιεί δύο ρυθμιστικές πρωτεΐνες που επιτελούν διαφορετικούς ρόλους, την InvF και HilA. Επίσης κωδικοποιεί και τα στοιχεία του συστήματος έκκρισης τύπου III, που καλούνται Inv/SPA και είναι απαραίτητα για την προσβολή και τη λοιμοτοξικότητα που προκαλούν στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Μια δεύτερη ζώνη παθογένειας 40 kb, η SPI-2, έχει εντοπιστεί σε χρωμόσωμα στο στέλεχος *S. enterica serovar Typhimurium* (Ochman *et al.*, 1996· Shea *et al.*, 1996). Η ζώνη SPI-2 που ευθύνεται για την πρόκληση συστηματικών νοσημάτων (systemic disease), περιέχει τουλάχιστον 17 γονίδια που

κωδικοποιούν ένα ρυθμιστικό σύστημα δύο στοιχείων και ένα σύστημα έκκρισης τύπου III που καλείται σύστημα Spi/SsA. Αυτά τα συστήματα ξεχωρίζουν από πλευράς δομής και λειτουργίας από το σύστημα SPI-1 Inv/Spa και το σύστημα έκκρισης τύπου III που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία και τη λειτουργία των μαστιγίων σε άλλα βακτηριακά γένη. Μια ακόμα περιοχή 7.8 kb η οποία εντοπίζεται στο μεγάλο πλασμίδιο λοιμοτοξικότητας (large virulence plasmid) του βακτηρίου *Salmonella spp* και κωδικοποιεί πέντε γονίδια *spvRABCD*, είναι επίσης υπεύθυνη για την λοιμοτοξικότητα που προκαλεί το παθογόνο.

1.1.6 Συσχετισμός με τα τρόφιμα

Η σαλμονέλωση περιγράφεται ως μόλυνση προερχόμενη από τα ζώα, δεδομένου ότι η σημαντικότερη αιτία της ασθένειας αυτής στον άνθρωπο είναι η επαφή με τα μολυσμένα ζώα ή τα προϊόντα τους. Ανεπαρκής ή απύσχα τελική θερμική επεξεργασία είναι οι πιο κοινοί παράγοντες που συμβάλλουν στην πρόκληση κρουσμάτων σαλμονέλωσης και επιτρέπουν στον παθογόνο να αναπτυχθεί στα τρόφιμα. Το κρέας, το γάλα, τα πουλερικά και τα αυγά είναι εν δυνάμει φορείς του βακτηρίου, οι οποίοι αν δεν δεχτούν την απαιτούμενη επεξεργασία επιτρέπουν στην σαλμονέλα να επιζήσει και δύνανται να προκαλέσουν διασταυρούμενη επιμόλυνση σε άλλα τρόφιμα που καταναλώνονται χωρίς περαιτέρω μαγείρεμα. Τα τελευταία έτη, φρέσκα προϊόντα όπως τα φρούτα και τα λαχανικά έχουν επιστήσει την προσοχή σαν μέσα μετάδοσης, όπου η επιμόλυνση από αυτά μπορεί να συμβεί σε πολλαπλά στάδια της τροφικής αλυσίδας (Bouchrif *et al.*, 2009).

Το περιβάλλον που επιμολύνεται με τον παθογόνο μικροοργανισμό λειτουργεί σαν πηγή λοίμωξης διότι το βακτήριο *Salmonella* μπορεί να επιβιώσει στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μετά από αυτό, η σαλμονέλα μεταδίδεται σε φορείς όπως αρουραίους, μύγες και πτηνά όπου μπορεί να εγκατασταθεί στα κόπρανα τους για εβδομάδες ή ακόμα και μήνες.

Μετά την άμεση μετάδοση, ζώα όπως οι χοίροι, οι αγελάδες και τα κοτόπουλα ενεργούν ως σημαντικός παράγοντας επικινδυνότητας για λοίμωξη. Αυτά τα ζώα-«φορείς» έχουν μολυνθεί από το στόμα, επειδή η σαλμονέλα προέρχεται συνήθως από το μολυσμένο περιβάλλον, αλλά και τις μολυσμένες ζωοτροφές. Ο άνθρωπος

μολύνεται τρώγοντας τροφή ή πίνοντας νερό που έχει μολυνθεί από *Salmonella* μέσω των ζώων- «φορέων». Ωστόσο, το *Salmonella Typhi* και *Salmonella paratyphi A*, δεν έχουν ζώα-«φορείς», ως εκ τούτου η λοίμωξη μπορεί να συμβεί με την κατανάλωση τροφίμων, στα οποία έχουν ακολουθηθεί εσφαλμένοι χειρισμοί από μολυσμένα άτομα (Newell *et al.*, 2010).

Εξάλλου, η μετάδοση της σαλμονέλας στις εγκαταστάσεις και στον εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων για την παρασκευή τροφίμων είναι επίσης πολύ μεγάλης σημασίας. Από την στιγμή που υπάρχει σε «φορείς» ή μεταφέρεται στα τρόφιμα, η κατανάλωση από τον άνθρωπο μπορεί να οδηγήσει στον κίνδυνο της σαλμονέλλωσης. Τα κύτταρα *Salmonella* μπορούν να προσκολληθούν με επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, όπως η πλαστική επιφάνεια κοπής που μπορεί να εξελιχθεί σε βιουμένιο και ως εκ τούτου να προκαλέσει τη διασταυρούμενη επιμόλυνση.

Κατά συνέπεια, το βακτήριο *Salmonella* μπορεί να εισέλθει σε οποιοδήποτε σημείο στην τροφική αλυσίδα από τις ζωοτροφές, την παραγωγή τροφίμων, την επεξεργασία και το λιανικό εμπόριο καθώς και στους χώρους εστίασης ή στην οικιακή προετοιμασία του φαγητού (Wong *et al.*, 2002). Οι κύριες ομάδες τροφίμων που σχετίζονται με σαλμονέλλωση παρουσιάζονται στον πίνακα 1.3.

Πίνακας 1.3: Παραδείγματα κρουσμάτων σαλμονέλλωσης που έχουν αναφερθεί (Pui *et al.*, 2011).

Year	Country	Source	Serotype	Number of cases	Reference
2010	United States	Black and red pepper	Montevideo	272	CDC, 2010
2010	United States	Frozen mamey fruit pulp	Typhi	9	CDC, 2010
2010	United States	Shell eggs	Enteritidis	2,752	CDC, 2010
2009	United States	Alfalfa sprouts	Saintpaul	235	CDC, 2010
2008	United States	Cereal from Malt-O-Meal	Agona	28	CDC, 2010
2007	United States	Dry pet food	Schwarzengrund	62	CDC, 2010
2006	United States	Peanut butter	Tennessee	>288	Montville and Matthews, 2008
2005	Austria	Mixed salad	Enteritidis PT21	85	D'Aoust and Maurer, 2007
2005	England	Kebab	Enteritidis PT1	195	D'Aoust and Maurer, 2007
2005	The Netherlands	Imported raw beef	Typhimurium PT104	165	D'Aoust and Maurer, 2007
2005	Malaysia	Stall food	Typhi	171	Nik and Sharifah, 2005
2004	China	Cake/raw egg topping	Enteritidis	197	D'Aoust and Maurer, 2007
2004	Great Britain	Lettuce	Newport	>350	Montville and Matthews, 2008
2003	Germany	Aniseed herbal tea	Agona	42	D'Aoust and Maurer, 2007
2001	Canada, Australia	Shandong peanuts	Stanley	93	D'Aoust and Maurer, 2007
2001	Norway, Sweden	Fish	Livingstone	60	D'Aoust and Maurer, 2007
2000	Singapore	Dried anchovy	Typhimurium DT104L	33	Ling <i>et al.</i> , 2002
1999	Japan	Dried squid	<i>Salmonella</i> spp.	<453	Montville and Matthews, 2008
1996	France	Mont D'or cheese	<i>Salmonella</i> spp.	14	Colak <i>et al.</i> , 2007
1994	Switzerland	Potato salad prepared by carrier	Typhi	10	Gruner <i>et al.</i> , 1997

Αναφορές παρακολούθησης της νόσου συχνά αναφέρουν τα πουλερικά (κοτόπουλα, γαλοπούλες, χήνες και πάπιες) ως τα κύρια οχήματα για την σαλμονέλλωση. Τα *Salmonella Pullorum* και *Salmonella gallinarum* συνήθως

προσβάλλουν τα πουλερικά. Στο άρθρο των Cox και Pavic (2010) παρέχεται εκτενής αναφορά για την παραγωγή κρέατος πουλερικών που σχετίζεται με τη σαλμονέλα και αναφέρονται προσεγγίσεις για τον έλεγχο του παθογόνου σε όλη την αλυσίδα παραγωγής, διότι τα πουλερικά μπορεί να μολυνθούν από τα σμήνη πουλερικών αναπαραγωγής, από το εκκολαπτήριο, από τις ζωοτροφές, από τα απορρίμματα, το νερό. Στη Μαλαισία, ο Arumugaswamy *et al.* (1995) ανέφερε ότι το 39,4% από τις μερίδες κοτόπουλου, 35,3% από το συκώτι κοτόπουλου και 44,4% από το στομάχι κοτόπουλου ήταν μολυσμένα με *Salmonella* spp.

Επιπρόσθετα, η σαλμονέλα μπορεί να εισέλθει στα αυγά από τους ωαγωγούς (κυρίως στις πάπιες). Η διείσδυση στο αυγό αυξάνεται όταν η μεμβράνη έχει υποστεί βλάβη, το εξωτερικό κέλυφος του αυγού είναι υγρό, η θερμοκρασία είναι μειωμένη και το ειδικό βάρος του κελύφους είναι χαμηλό. Η μόλυνση των αυγών και ιδιαίτερα του περιεχομένου των αυγών από τον *Salmonella* Enteritidis θεωρείται ότι είναι η αιτία της μεγάλης επιδημίας στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική στην δεκαετία του 1980 (Jay *et al.*, 1997; Bhunia, 2008). Πρόσφατα, τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) των ΗΠΑ ανέφεραν ότι υπήρχαν περίπου 1.469 ασθένειες που αναφέρθηκαν στην Καλιφόρνια, το Κολοράντο και Μινεσότα από την 1η Μαΐου έως και την 31 Αυγούστου 2010, οι οποίες σχετίζονταν με αυγά που έχουν μολυνθεί από το *Salmonella* enteritidis, Από την άλλη πλευρά, το κυρίαρχο ορότυπο στην αυστραλιανή βιομηχανία αυγών ήταν ο *Salmonella* Infantis (Cox *et al.*, 2002).

Η εξάπλωση της σαλμονέλας μπορεί να διευκολυνθεί από τις δεξαμενές αποθήκευσης νερού σε ένα κτίριο, από τα περιττώματα των άγριων ζώων ή ακόμη και από τα πτώματα ζώων. Η κακή υγιεινή, η ακατάλληλη απόρριψη λυμάτων και η έλλειψη καθαρού νερού προκαλεί τη μετάδοση του τυφοειδούς πυρετού. Σε περιοχές όπου ο τυφοειδής πυρετός είναι ενδημικός, το νερό από τις λίμνες ή τα ποτάμια που χρησιμοποιούνται για δημόσια κατανάλωση και μερικές φορές έχουν μολυνθεί από ακατέργαστα λύματα, αποτελεί την κύρια πηγή μόλυνσης. Η κατανάλωση άβραστου νερού κατά τη διάρκεια επιδημίας τύφου στο Dushanbe του Τατζικιστάν το 1997 προκάλεσε 2200 κρούσματα της ασθένειας και 95 θανάτους. Η μόλυνση με σαλμονέλα των φρέσκων προϊόντων, θα μπορούσε να οφείλεται στην είσοδο της σαλμονέλας μέσα από τις ρωγμές των ιστών, στην παγίδευση κατά την εμβρυογένεση των προϊόντων, στη φυσική πρόσληψη μέσω της ρίζας και στη μεταφορά σε βρώσιμους ιστούς φυτών κατά τη διάρκεια της κοπής. Ο κίνδυνος για την ανθρώπινη

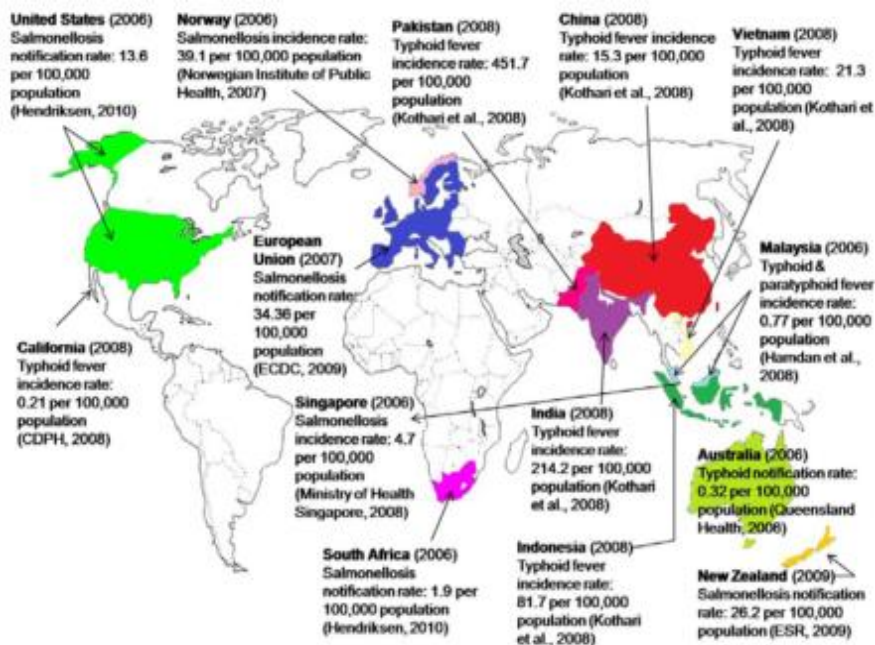
υγεία αυξήθηκε περαιτέρω διότι η σαλμονέλα αναπτύσσονταν στα φρέσκα προϊόντα κατά τη διάρκεια της λιανικής πώλησης τους, όταν αυτά εκτίθονταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το 2000, ένα πεπόνι από το Μεξικό κατέληξε να γίνει η αιτία σε ένα ξέσπασμα σαλμονέλας στις ΗΠΑ (Penteado και Leito, 2004; Bordini *et al.*, 2007).

1.1.7 Επιδημιολογία

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, οι ορότυποι *Salmonella enteritidis* και *Salmonella* Typhimurium αναφέρονται ως οι δύο κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες της σαλμονέλλωσης στον άνθρωπο. Στις ΗΠΑ, τα *Salmonella enteritidis* και Typhimurium αντιπροσωπεύουν τις δύο πιο συχνά αναφερόμενους ορότυπους σύμφωνα με Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Κέντρα για τον Έλεγχο των Ασθενειών, 2006). Η κατανομή των οροτύπων της σαλμονέλας σε Αυστραλία ποικίλλει γεωγραφικά. Έτσι, ενώ το *S. Typhimurium* ήταν ο πιο συχνά αναφερόμενος ορότυπος το 2008, το *S. Enteritidis* είχε συχνά αναφερθεί ως αιτία μολύνσεων του ανθρώπου, παρά το γεγονός ότι δεν είναι ενδημική στην Αυστραλία (Yates, 2011). Ενώ το *S. Enteritidis* είναι ως επί το πλείστον εμπλεκόμενο με την κατανάλωση πουλερικών και αυγών, το *S. Typhimurium* συνδέεται με ζώα που παράγουν προϊόντα, όπως τα πουλερικά, τους χοίρους, τα βοοειδή και τα πρόβατα. Το *S. Enteritidis* ήταν ένας σπάνιος ορότυπος μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980, όταν εμφανίστηκε ως μια συχνή αιτία της σαλμονέλλωσης στις ευρωπαϊκές χώρες και σε όλο τον κόσμο (Cogan & Humphrey, 2003; Poppe, 1999). Μέχρι τη δεκαετία του 1990, το *S. Enteritidis* αντικαθιστά το *S. Typhimurium* ως τον πιο κοινό ορότυπο σαλμονέλας που απομονώνεται από ανθρώπους σε πολλές χώρες (Angulo & Swerdlow, 1999; Cogan & Humphrey, 2003; Tschape *et al.*, 1999). Στην Αυστραλία και την Νέα Ζηλανδία, ωστόσο, παρουσιάστηκε ένας σχετικά υψηλότερος αριθμός κρουσμάτων λόγω της *S. Typhimurium* σε σύγκριση με τον Καναδά, τις ΗΠΑ και την ΕΕ (Dalton *et al.*, 2004). Τα προηγούμενα ξεσπάσματα σαλμονέλλωσης στον Καναδά και τις ΗΠΑ έχουν συνδεθεί με το *S. Enteritidis* (Κέντρα για τον Έλεγχο των Ασθενειών, 2004). Η παγκόσμια διανομή των τροφίμων και η συνεχής μετακίνηση των ανθρώπων σε όλο τον κόσμο διευκολύνουν την εξάπλωση αυτού του παράγοντα, που επιτρέπει την παρουσίαση νεοεμφανιζόμενων οροτύπων *Salmonella* στις χώρες που εισάγονται.

Οι τυφοειδείς περιπτώσεις είναι σταθερά σε χαμηλούς αριθμούς στις αναπτυγμένες χώρες, αλλά η μη-τυφοειδής σαλμονέλωση έχει αυξηθεί σε όλο τον κόσμο. Ο τυφοειδής πυρετός συνήθως προκαλεί θνησιμότητα στο 5 έως 30% των μολυσμένων ατόμων στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization,WHO) εκτιμά ότι 16 με 17 εκατομμύρια περιπτώσεις εμφανίζονται ετησίως, που έχουν ως αποτέλεσμα περίπου 600.000 θανάτους. Τα ποσοστά θνησιμότητας διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή, αλλά μπορεί να είναι από 5 έως 7%, παρά τη χρήση της κατάλληλης αντιβιοτικής θεραπείας. Από την άλλη πλευρά, οι μη-τυφοειδείς περιπτώσεις αντιστοιχούν σε 1,3 δισεκατομμύρια κρούσματα με 3 εκατομμύρια θανάτους. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, προκύπτουν περίπου 2 έως 4 εκατομμύρια κρούσματα γαστρεντερίτιδας από *Salmonella* με περίπου 500 θανάτους ετησίως. Μια ακριβέστερη εικόνα της σαλμονέλωσης είναι δύσκολο να προσδιοριστεί, επειδή συνήθως διερευνούνται μόνο περιπτώσεις με μεγάλο αριθμό κρουσμάτων και όχι τόσο τα σποραδικά κρούσματα. Δεδομένα για τη σαλμονέλωση είναι σπάνια σε πολλές χώρες της Ασίας, της Αφρικής και της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής, όπου μόνο το 1 έως 10% των περιπτώσεων αναφέρονται (Portillo, 2000; Hanes, 2003; Hu and Kopecko, 2003). Μερικά στοιχεία για τα ποσοστά των κρουσμάτων φαίνονται στην εικόνα 1.4.

Ο Τυφοειδής πυρετός είναι ενδημικός σε όλη την Αφρική και την Ασία καθώς και στη Μέση Ανατολή, την Ανατολική και ορισμένες χώρες της Νότιας Ευρώπης και της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής. Στις ΗΠΑ και στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, ο τυφοειδής πυρετός είναι μια ασθένεια κατά κύριο λόγο του «ταξιδιώτη που επιστρέφει». Η τυφοειδής επίπτωση σε ενδημικές περιοχές είναι συνήθως χαμηλή κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής, κορυφώνεται σε παιδιά σχολικής ηλικίας και νεαρούς ενήλικες και στη συνέχεια παρουσιάζει πτώση στη μέση ηλικία. Οι περισσότερες μολύνσεις συμβαίνουν κατά την παιδική ηλικία, ιδίως στο Δέλτα του Μεκόνγκ περιοχή του Βιετνάμ και είναι αναγνωρίσιμες αν και συχνά ήπιες.



Εικόνα 1.4: Μερικές περιπτώσεις σαλμονέλλωσης και εντερικού πυρετού σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου (Pui *et al.*, 2011).

Η μολυσματική δόση της σαλμονέλλας εξαρτάται από τον ορότυπο, το στέλεχος του βακτηρίου, την φάση της ανάπτυξης και ευαισθησία του ξενιστή. Από την άλλη πλευρά, οι παράγοντες του ξενιστή που ελέγχουν την ευαισθησία σε λοιμώξεις περιλαμβάνουν την κατάσταση του εντερικού σωλήνα, την ηλικία, τα ήδη υπάρχοντα νοσήματα ή ανοσοανεπάρκειες. Η μολυσματική δόση της σαλμονέλλας κυμαίνεται από 1 έως 10^9 cfu / g. Ωστόσο, κρούσματα με πηγή ένα μόλις τρόφιμο (single-food-source) δείχνουν ότι μόλις 1 έως 10 κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν σαλμονέλλωση στις πιο ευπαθείς σε μόλυνση YOPH ομάδες (Young, Old, Pregnant, Immuno-compromised) (Yousef and Carlstrom, 2003; Bhunia, 2008).

1.1.8 Επιβίωση του μικροοργανισμού *Salmonella spp.* υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης

Η ομοίωση του εσωτερικού pH του κυττάρου του μικροοργανισμού *Salmonella spp.* όταν αυτός εκτίθεται σε ακραία όξινη τιμή pH, διατηρείται όταν ο μικροοργανισμός έχει προηγουμένως υποστεί ήπια όξινη καταπόνηση. Αυτό

επιτρέπει τη σύνθεση εκ μέρους του βακτηριακού κυττάρου πρωτεϊνών όξινης καταπόνησης (acid stress proteins) όταν βρεθεί αργότερα σε πολύ χαμηλές τιμές pH περιβάλλοντος, κάτι το οποίο θα ήταν ανέφικτο σε κύτταρα που δεν θα είχαν υποστεί αυτή την αρχική προσαρμογή και θα εκτίθονταν απευθείας σε ακραία όξινες τιμές pH. Ένα από τα συστήματα που συμβάλλουν στη διατήρηση της ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού σε συνθήκες όξινης καταπόνησης είναι το σύστημα αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης (lysine decarboxylase - CadA) το οποίο λειτουργεί σε συνδυασμό με ένα μεταφορέα λυσίνης:καδαβερίνης (CadB) (Park *et al.*, 1996).

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. μπορεί να επιζήσει πολλών διαφορετικών συνθηκών όξινης καταπόνησης, αφού η επιβίωσή του εξαρτάται από το ποιά αμινοξέα είναι διαθέσιμα στο περιβάλλον ανάπτυξης (λυσίνη, ορνιθίνη, αργινίνη) οπότε και θέτει σε «λειτουργία» το αντίστοιχο σύστημα επαγωγής οξεοανθεκτικότητας.

Έχουν αναγνωριστεί τρεις ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι RpoS, Fur και PhoP, που ελέγχουν διάφορα συστήματα ανθεκτικότητας στην όξινη καταπόνηση και προκαλούν την έκφραση μιας ομάδας πρωτεϊνών σε αυτές τις συνθήκες. Ακόμη ο παράγοντας σίγμα, σ^S , που κωδικοποιείται από το *rpoS* ρυθμίζει ένα μέρος της οξεοανθεκτικότητας της *Salmonella* spp. και αποτελεί επίσης ένα κρίσιμο ρυθμιστή της φυσιολογίας του κυττάρου κατά την στατική φάση ανάπτυξης αλλά έχει αποδειχτεί η χρησιμότητά του και κατά την εκθετική φάση (Hengge-Aronis, 1996). Μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ανωτέρω ρυθμιστικές πρωτεΐνες οδηγούν σε πιθανή μείωση της ανθεκτικότητας του κυττάρου σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, αποδεικνύοντας το σπουδαίο ρόλο που επιτελούν σ' αυτό τον τομέα.

1.2 ΥΓΙΕΙΝΗ ΚΟΥΖΙΝΑΣ

1.2.1 Εισαγωγή

Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι το ποσοστό των τροφιμογενών νόσων αυξάνεται. Σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη των πολιτών ότι οι τροφικές λοιμώξεις προέρχονται από εγκαταστάσεις όπως τα εστιατόρια, τα δεδομένα από

διάφορες χώρες δείχνουν ότι πολλά κρούσματα προέρχονται από την οικία (Knabel, 1995; Scuderi *et al.*, 1996).

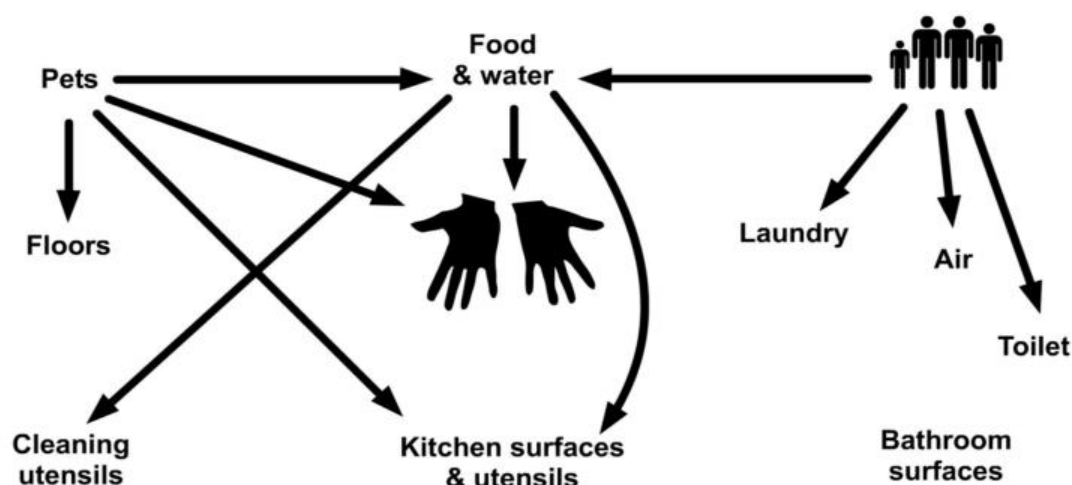
Υπάρχουν πολλοί λόγοι που μπορεί να εξηγήσουν την αύξηση της συχνότητας των γαστρεντερικών λοιμώξεων που συνδέονται με το οικιακό περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στην εμπορική παραγωγή τροφίμων (ελάχιστη επεξεργασία) και στις οικιακές πρακτικές προετοιμασίας τροφίμων (μικρότερη ευαισθητοποίηση γύρω από την υγιεινή των τροφίμων).

Επιπλέον, η συνεχιζόμενη εμφάνιση παθογόνων αποτελεί ένα σοβαρό παγκόσμιο πρόβλημα. Επίσης, οι δημογραφικές αλλαγές αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης στο σπίτι. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 20% του πληθυσμού (οι πολύ νέοι, οι ηλικιωμένοι, οι έγκυες και οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς) μπορούν να ταξινομηθούν σε μία ομάδα «ψηλού κινδύνου» (Gerba *et al.*, 1996). Η κύρια αιτία των τροφιμογενών λοιμώξεων περιλαμβάνει την προετοιμασία των τροφίμων πολύ πρωτότερα της κατανάλωσης του (που επιτρέπει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών που υπάρχουν στο τρόφιμο σε επίπεδα που υπερβαίνουν την ελάχιστη μολυσματική δόση), την ακατάλληλη και ανεπαρκής ψύξη και την ανεπαρκή αναθέρμανση. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η διασταυρούμενη επιμόλυνση, μέσω απλής επιφάνειας είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας (Roberts, 1982; Ryan *et al.*, 1996).

Οι κύριες πηγές μόλυνσης στο οικιακό περιβάλλον είναι οι άνθρωποι, τα κατοικίδια ζώα, τα παράσιτα και τα μολυσμένα τρόφιμα και νερό. Τα μικρόβια μεταδίδονται μέσω άμεσης επαφής με τους ανθρώπους ή τα ζώα, από τα μολυσμένα τρόφιμα, το νερό, τον αέρα και τις επιφάνειες (Εικόνα 1.5). Υπό συνθήκες ευνοϊκές για τους μικροοργανισμούς, μπορούν να επιβιώσουν ή να πολλαπλασιαστούν σε μεγάλους αριθμούς. Ειδικά σε μέρη που διατηρούνται υγρά για μεγάλο χρονικό διάστημα σημαντικές ποσότητες των μικροοργανισμών έχουν βρεθεί, μεταξύ των οποίων και παθογόνοι τύποι (Beumer *et al.*, 1996; Parry *et al.*, 1998).

Κατά την προετοιμασία μολυσμένων τροφίμων, οι παθογόνοι εύκολα μεταδίδονται σε μαγειρικά σκεύη (π.χ. επιφάνειες κοπής, μαχαίρι) ή μέσω του καθαρισμού των επιφανειών (πετσέτες κουζίνας). Ορισμένοι παθογόνοι (*Salmonella* και *Campylobacter*) βρίσκονται μόνο κατά τη διάρκεια και αμέσως μετά την προετοιμασία των μολυσμένων τροφίμων, ενώ μεγάλος αριθμός από άλλους τύπους

(*Listeria monocytogenes*) είναι επίσης παρόντες και σε άλλα χρονικά σημεία (de Wit *et al.*, 1979; De Boer and Hahné, 1990; Scott and Bloomfield, 1990).



Εικόνα 1.5: Τρόποι μετάδοσης των μικροοργανισμών εντός της οικίας

1.2.2 Υγιεινή οικίας

Η φράση «Υγιεινή της οικίας» δεν αναφέρεται απλώς στον καθαρισμό του σπιτιού (καθημερινά). Στην πράξη, ο καθαρισμός δεν είναι το μόνο σημαντικό ζήτημα, το να γνωρίζεις πώς να αποτραπεί η μόλυνση είναι εξίσου καθοριστικό. Το αυξημένο ενδιαφέρον για την υγιεινή του σπιτιού έχει οδηγήσει μια διεθνή ομάδα εμπειρογνομόνων να σχηματίσουν το Διεθνές Επιστημονικό Φόρουμ για την Οικιακή Υγιεινή (IFH). Η οργάνωση αυτή αποσκοπεί στην ευαισθητοποίηση του ρόλου της υγιεινής της οικίας για την πρόληψη μολυσματικών ασθενειών και την προώθηση της κατανόησης των πρακτικών, που βασίζονται στην αξιολόγηση των επιστημονικών αρχών. Ως μέρος της εργασίας αυτής το IFH έχει εκδώσει οδηγίες για την οικιακή υγιεινή (IFH, 1998; Beumer *et al.*, 1999). Το βασικό χαρακτηριστικό αυτών των κατευθυντήριων οδηγιών είναι ότι βασίζονται στην έννοια της αξιολόγησης του κινδύνου και της πρόληψη των κινδύνων.

Η υγιεινή της οικίας είναι το σύνολο των μέτρων που χρησιμοποιούνται για την παρεμπόδιση της μόλυνσης και της μεταφορά της στο περιβάλλον του σπιτιού. Τα απαιτούμενα μέτρα υγιεινής μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις ομάδες:

1. υγιεινή τροφίμων
2. προσωπική υγιεινή και καθαριότητα
3. υγιεινή οικιακού περιβάλλοντος
4. ιατρική περίθαλψη στο σπίτι

Η ιατρική περίθαλψη στο σπίτι (δηλαδή έλεγχος των λοιμώξεων στο σπίτι, σε αντίθεση με τον έλεγχο τους στο νοσοκομείο) περιλαμβάνει ειδικές καταστάσεις ελεγχόμενου ή αυξημένου κίνδυνου, όπως η φροντίδα των νεογνών και ηλικιωμένων, και τα μέτρα ελέγχου των λοιμώξεων που συνδέονται με την κατ'οίκον νοσηλεία ατόμων με καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις στην οικία έρχονται σαν αποτελέσματα, όπως προαναφέρθηκε, από έναν ή συνδυασμό των ακόλουθων παραγόντων: ανεπαρκής μαγείρεμα, ανεπαρκής συντήρηση των τροφίμων, ή διασταυρούμενη επιμόλυνση κατά το χειρισμό του μολυσμένου τροφίμου. Μία από τις δυσκολίες στην ανάπτυξη καλών πρακτικών υγιεινής στην κουζίνα είναι η κατανόηση της σχετικής έκτασης του κινδύνου αυτών των παραγόντων. Μια μελέτη του Roberts (1990), κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, αν και τα περισσότερα τροφιμογενή ξεσπάσματα λοιμώξεων (outbreaks) ήρθαν σαν αποτέλεσμα από τον πλημμελή έλεγχο της θερμοκρασίας των ωμών και μαγειρεμένων τροφίμων, πολλά είναι αυτά που συνδέονται με την διασταυρούμενη επιμόλυνση. Αυτή η μελέτη πρότεινε ότι διασταυρούμενη επιμόλυνση έχει εμπλακεί σε περίπου 6% των κρουσμάτων και η κακή υγιεινή των χεριών σε περίπου 4% των κρουσμάτων. Μια άλλη έκθεση (Roberts, 1986) πρότεινε ότι η διασταυρούμενη επιμόλυνση είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει σε ποσοστό έως 14% των κρουσμάτων *Salmonella*. Οι Ryan *et al.* (1996) εκτίμησαν ότι η κακή υγιεινή που αφορά τα χέρια και άλλες επιφάνειες είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει σε ποσοστό έως 39% των οικιακών κρουσμάτων τροφικής δηλητηρίασης. Σε μια αξιολόγηση των αναφερθέντων κρουσμάτων που συνδέονται με τα βρετανικά νοικοκυριά για το 1992-1999, οι Gillespie *et al.* υπολόγισαν ότι, από το 85% των κρουσμάτων που ορίστηκαν ως τροφιμογενή, η διασταυρούμενη επιμόλυνση είχε εμπλακεί στο 20% των κρουσμάτων σε σύγκριση με το 30 και 31% αντίστοιχα για ξεσπάσματα στα οποία η ανεπαρκής συντήρηση και μαγείρεμα θεωρούνταν ως αιτία.

1.2.3 Παρουσία των παθογόνων μικροοργανισμών στην οικία και τις οικιακές κουζίνες

Μελέτες στο οικιακό περιβάλλον από τους Finch *et al.*, (1978), Scott *et al.*, (1982), Speirs *et al.*, (1995), Josephson *et al.*, (1997) και Rusin *et al.*, (1998) δείχνουν ότι οι μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων δυνητικά παθογόνων ειδών, συνήθως βρίσκονται σε όλους τους χώρους του οικιακού περιβάλλοντος.

Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δείχνουν ότι υγρές περιοχές, όπως οι περιοχές του νεροχύτη της κουζίνας και οι τουαλέτες, συνδέονται πιο συχνά με έντονη μόλυνση και με την εμφάνιση πιθανά επιβλαβών ειδών. Άλλες περιοχές με υγρασία, όπως τα πανιά για το πλύσιμο των πιάτων, τα σφουγγάρια και άλλα παρόμοια μέσα καθαρισμού, βρέθηκαν επίσης να είναι συχνά και σε μεγάλο βαθμό μολυσμένες. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στην κουζίνα, αν και τα ωμά τρόφιμα είναι ίσως η κύρια πηγή μόλυνσης, ο νεροχύτης μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως δεξαμενή που «φιλοξενεί» και ενθαρρύνει τη εγκατάσταση πληθυσμών από βακτήρια και μύκητες. Ομοίως, στο μπάνιο ή στην τουαλέτα, αν και τα εντερικά βακτήρια πιθανότατα προέρχονται από την τουαλέτα ή απευθείας από τον άνθρωπο, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μπανιέρες, οι λεκάνες και οι πετσέτες μπορεί να αποτελούν ημι-μόνιμες δεξαμενές βακτηρίων. Τα συμπεράσματα αυτά υποστηρίζονται περαιτέρω από εργαστηριακές μελέτες (Scott & Bloomfield, 1990a, 1990b; Scott, 1990), οι οποίες έδειξαν την ικανότητα των Gram-αρνητικών ειδών, όπως τα *E. coli*, *Klebsiella* spp. και οι Ψευδομονάδες να αυξάνονται σε σημαντικό αριθμό σε δείγματα του νεροχύτη, του νερού τουαλέτας και μολυσμένων βρεγμένων υφασμάτων. Το Enterobacteriaceae spp. απομονώθηκε στην μελέτη του Scott *et al.*, (1982), συμπεριλαμβανομένων των *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus* και *E. coli*. Μια παρόμοια τάση αναφέρθηκε επίσης στις μελέτες των Finch *et al.* (1978) και Speirs *et al.*, (1995). Αν και αυτά τα είδη, κανονικά δεν είναι παθογόνα για τους υγιείς ενήλικες, πρέπει να θεωρηθούν ως δείκτες κακής υγιεινής. Άλλα είδη που απομονώθηκαν συμπεριλαμβάνουν *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus*. Σε μια έρευνα από 213 σπίτια, βρέθηκε *Listeria* spp. στο 47,4% περίπου των σπιτιών και ανακτήθηκαν από υγρές περιοχές, όπως νεροχύτες, πετσέτες κουζίνας, βούρτσες πλυσίματος, ψυγεία και οδοντόβουρτσες (Beumer *et al.*, 1996). Ο Speirs *et al.* (1995) απομόνωσαν *Listeria monocytogenes* από επιφάνειες ψυγείων στο 2,2%

των κατοικιών. Το *Yersinia enterocolitica* επίσης απομονώθηκε από την περιοχή του νεροχύτη στο 4,2% των σπιτιών, και ο μικροοργανισμός *Bacillus cereus* από το 10,9% των σπιτιών.

Πίνακας 1.4 : Καταγεγραμμένες απομονώσεις παθογόνων μικροοργανισμών από συγκεκριμένες τοποθεσίες στο χώρο προετοιμασίας τροφίμων (Redmond and Griffith, 2009).

Environmental site	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> spp.
Dishcloth	•			•	•	•		•	•
Cleaning cloth	•	•		•	•		•		•
Washing-up sponge	•	•		•	•				•
Washing-up brush					•			•	•
Wash cloth		•						•	
Floor mop					•	•			•
Tea/Hand towel				•	•	•			
Sink		•	•	•	•		•	•	•
Taps				•	•		•		
Refrigerator/Door	•			•	•		•	•	•
Waste/Pedal bin	•			•	•	•			
Chopping boards	•			•	•				
Work surfaces	•				•	•			
Floors	•				•				

Οι Enríquez *et al.* (1997), απομόνωσαν και ταυτοποίησαν 23 διαφορετικά είδη βακτηρίων από 140 σφουγγάρια και 13 είδη βακτηρίων από 56 πετσέτες κουζίνας από σπίτια των ΗΠΑ. Τα πιο συνηθισμένα βακτήρια ήταν τα *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonas* spp. Το παθογόνο βακτήριο *Salmonella* spp. εντοπίστηκε στο 15% των σφουγγαριών και στο 14% των πετσετών. Το *Pseudomonas* spp. ήταν παρόν στο 36% των σφουγγαριών και 31% των πετσετών. Το *Staphylococcus aureus* ήταν παρόν στο 20% των σφουγγαριών και 19% των πετσετών. Μια βρετανική μελέτη βρήκε επίσης το 84% των δειγμάτων, από πετσέτες κουζίνας, μολυσμένα με *Listeria* spp. (Duggan και Phillips, 1998). Οι Hilton και Austin (2000) έπραξαν δειγματοληψία σε 100 πετσέτες κουζίνας και σφουγγάρια από τις εγχώριες κουζίνες και απομόνωσαν *Staphylococcus* από το 4% των υλικών τύπου-σφουγγάρι, με τον πληθυσμό του να κυμαίνεται από 10^2 έως 4×10^4 cfu/ml. Ο συνολικός μικροβιακός πληθυσμός κυμαινόταν από 20 έως 6×10^8 cfu/ml με μέσο όρο $8,5 \times 10^7$ cfu/ml.

Το γεγονός ότι σε όλες εκτός από μία από αυτές τις μελέτες (Josephson *et al.* 1997) δεν είχαν απομονωθεί βασικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί, όπως οι *Salmonella*

και *Campylobacter*, δεν πρέπει να εκληφθεί ως ένδειξη ότι οι εν λόγω μικροοργανισμοί δεν υπάρχουν στο σπίτι. Στη μελέτη του Josephson σε 10 κατοικίες των ΗΠΑ, το παθογόνο *Salmonella* spp. απομονώθηκε μία φορά (από σφουγγάρι) και το *Campylobacter* μόνο δύο φορές (από νεροχύτες).

Η πιθανότητα για έκθεση σε γαστρεντερικούς παθογόνους μικροοργανισμούς στην οικία ή σε άλλους χώρους από τον άνθρωπο, τα ζώα, τα τρόφιμα ή άλλες πηγές φαίνεται από μια σειρά εργαστηριακών μελετών και ερευνών που επιδεικνύουν τον βαθμό της διατήρησης και της εξάπλωσης των εντερικών βακτηρίων και των ιών στο περιβάλλον, που μπορεί να συμβεί κατά την προετοιμασία των τροφίμων στην κουζίνα και κατά τη διάρκεια άλλων συνηθισμένων καθημερινών δραστηριοτήτων. Παρ' όλο που οι οικιακές επιφάνειες, όταν είναι στεγνές έχει σαν αποτέλεσμα την θανάτωση των μικροοργανισμών, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός δεδομένων από εργαστηριακές μελέτες (Πίνακας 1.5) που δείχνει ότι οι εντερικοί παθογόνοι μπορούν να επιβιώσουν σε σημαντικούς αριθμούς για αρκετές ώρες, και σε ορισμένες περιπτώσεις, ημέρες και εβδομάδες, ιδιαίτερα σε υγρές, αλλά και σε στεγνές επιφάνειες.

Πίνακας 1.5: Διατήρηση γαστρεντερικών παθογόνων σε ξηρές επιφάνειες (Kramer *et al.*, 2006).

Type of bacteria	Duration of persistence (range)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Up to 6 days
<i>C. difficile</i> (spores)	5 months
<i>Escherichia coli</i>	1.5 h to 16 months
<i>Klebsiella</i> spp.	<90mins
<i>Helicobacter pylori</i>	less than 90 min
<i>Listeria</i> spp.	1 day to months
<i>Salmonella</i> spp.	1 day
<i>Shigella</i> spp.	2 days to 5 months
Adenovirus	7day – 3 months
Norovirus and feline calicivirus	8 h to 7 days
Rotavirus	6-60 days
Hepatitis A	2h - 60 days

Σε μια μελέτη των Beumer και te Giffel (1999), 15 τοποθεσίες (περιλαμβάνοντας πετσέτες κουζίνας, σανίδες κοπής, σκεύη) σε 250 οικιακές κουζίνες διερευνήθηκαν για την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων. Τα δείγματα εξετάστηκαν, χρησιμοποιώντας μεθόδους που περιγράφονται από τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (ISO), για την παρουσία του *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria*

monocytogenes και κολοβακτηρίδια συμπεριλαμβανομένης της *Escherichia coli*. Παραδόξως, σε κανένα από τα δείγματα που διερευνήθηκαν, δεν ανιχνεύθηκε *Salmonella*. Αυτό μπορεί να συνέβαλε το γεγονός ότι οι επιφάνειες δεν περιλήφθηκαν στα δείγματα κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά την προετοιμασία των γευμάτων. Άλλοι ερευνητές βρήκαν μια ενδεικτική σχέση μεταξύ του χειρισμού των μολυσμένων προϊόντων διατροφής και η παρουσία των Gram-αρνητικών παθογόνων σε επιφάνειες και σκεύη (de Wit *et al.*, 1979; De Boer και Hahné, 1990). Γενικά, 2-4 ώρες μετά την προετοιμασία των γευμάτων, ο αριθμός των Gram-αρνητικών παθογόνων μειώνεται δραματικά λόγω της ξήρανσης της επιφάνειας (Scott και Bloomfield, 1990). Gram-θετικά παθογόνα, εκτός από τον *Clostridium perfringens*, εντοπίστηκαν σε όλα τα σπίτια που διερευνήθηκαν. Το *Staphylococcus aureus* και *Bacillus cereus* ήταν τα κυρίαρχα στελέχη σε στεγνές επιφάνειες. Το *Listeria monocytogenes* βρέθηκε στο 10% των οικιών που διερευνήθηκαν, ενώ κολοβακτηρίδια απομονώθηκαν σε όλα τα σπίτια. Και οι δύο μικροοργανισμοί απομονώθηκαν κυρίως από υγρές επιφάνειες, όπως πετσέτες κουζίνας και μέρη με στάσιμο νερό (π.χ. νεροχύτης κουζίνας).

Περιοχές ή αντικείμενα με υψηλό αριθμό μικροοργανισμών, που μπορούν εύκολα να μεταδοθούν σε άλλες επιφάνειες θεωρούνται ως δεξαμενές / μέσα μετάδοσης (π.χ. πετσέτες κουζίνας). Για αυτές τις περιπτώσεις, όπου εντοπίζεται σημαντικός κίνδυνος, πρέπει να εφαρμόζονται αποτελεσματικές διαδικασίες υγιεινής για την πρόληψη της διασταυρούμενης επιμόλυνσης.

1.2.4 Διασταυρούμενη επιμόλυνση του παθογόνου *Salmonella* στην οικία

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) (1992), το 25% των τροφιμογενών ξεσπασμάτων (outbreaks) συνδέονται στενά με κρούσματα διασταυρούμενης επιμόλυνσης που περιλαμβάνουν ελλειπείς πρακτικές υγιεινής, μολυσμένο εξοπλισμό, μόλυνσης μέσω των ατόμων που χειρίζονται τρόφιμα, την επεξεργασία, ή την ανεπαρκή συντήρηση. Ο εντοπισμός των πηγών μόλυνσης συχνά αποδεικνύεται περίπλοκος διότι τα ακριβή δεδομένα είναι συχνά δύσκολο να ανευρεθούν από τις κυβερνήσεις, τις βιομηχανίες, αλλά και λόγω ελλιπών ερευνών.

Όταν η επιβίωση του παθογόνου *Salmonella* συμβαίνει υπό συνθήκες διασταυρούμενης μόλυνσης και επαναμόλυνσης, αρκετοί παράγοντες γίνονται κρίσιμοι. Αυτοί οι παράγοντες είναι οι ακατάλληλες θερμοκρασίες κατά την προετοιμασία των τροφίμων όπως και η επιβίωση λόγω λιγότερου ψησίματος (undercooking) ή τα σενάρια χειρισμού των τροφίμων.

Ο πιθανός κίνδυνος του *Salmonella* spp. να μολύνει περιοχές και επιφάνειες του νοικοκυριού έχει μελετηθεί (Gorman, Bloomfield, & Adley, 2002). Οι συγγραφείς τονίζουν πως η προετοιμασία των ωμών τροφίμων, όπως το φρέσκο κοτόπουλο μπορεί να αυξήσει τη διάδοση της σαλμονέλας στα χέρια και τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα (food contact surfaces). Ένα σημαντικό ποσοστό σεναρίων διασταυρούμενης επιμόλυνσης συμβαίνουν σε οικιακές κουζίνες. Στην πραγματικότητα, στην Ολλανδία, τη Γερμανία και την Ισπανία, περισσότερο από το 50% των αναφερθέντων κρουσμάτων τροφιμογενών παρατηρήθηκαν σε οικία (Beumer, Bloomfield, Exner, Fara, & Scott, 1998; Scott, 1996). Πολλοί συγγραφείς έχουν δείξει ότι τα κύτταρα από *Salmonella* κατεψυγμένων κοτόπουλων ήταν σε θέση να μολύνουν χώρους προετοιμασίας τροφίμων (De Wit, Brockhuizen, & Kampelmacher, 1979; Roberts, 1972; Van Schothorst, Huisman, & Van Os, 1978). Ομοίως, οι De Boer και Hahne (1990) έδειξαν την ευκολία με την οποία το βακτήριο *Salmonella* μπορεί να μεταφερθεί από το κοτόπουλο σε σκεύη κουζίνας, σε μια ποικιλία από επιφάνειες της κουζίνας, στα χέρια και σε άλλα τρόφιμα. Τα κύτταρα της σαλμονέλας ανακτήθηκαν από τις επιφάνειες έως 6 ώρες μετά τη μόλυνση. Η ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σχετικά με την ανάγκη να εφαρμόσουν ορθές πρακτικές υγιεινής (Good Hygiene Practices, GHP) είναι υψίστης σημασίας, προκειμένου να αποτραπεί η εξάπλωση των κυττάρων *Salmonella* στους χώρους προετοιμασίας τροφίμων.

Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Klontz, Timbo, Fein, και Levy (1995) σχετικά με τις πρακτικές υγιεινής, το 25% των ερωτηθέντων ανέφεραν την επαναχρησιμοποίηση σανίδων κοπής χωρίς καθαρισμό, μετά τον τεμαχισμό ωμού κρέατος ή κοτόπουλου. Ως εκ τούτου, είναι λογικό να περιμέναμε μια μείωση της σαλμονέλωσης και άλλων τροφιμογενών νόσων, αν οι καταναλωτές εφαρμόζαν ασφαλείς πρακτικές χειρισμού των τροφίμων. Η διασταυρούμενη επιμόλυνση και τα ποσοστά μεταφοράς της *Salmonella enterica* από το κοτόπουλο στο μαρούλι εκτιμήθηκαν από τους Ravishankar, Zhu και Jaroni (2010) κάτω από διαφορετικά

σενάρια χειρισμού των τροφίμων, με και χωρίς την διαδικασία πλύσιματος. Η μελέτη έδειξε ότι το πλύσιμο μόνο με νερό δεν είναι αρκετό για να αφαιρεθεί το *S. enterica* ενώ όταν η διαδικασία του πλύσιματος, περιελάμβανε σαπούνι, ζεστό νερό και έντονο τρίψιμο ήταν κατάλληλη για να μειωθεί διασταυρούμενη επιμόλυνση.

Οι Cogan *et al.* (1999,2002) έδειξαν ότι, μετά την προετοιμασία μολυσμένων κοτόπουλων με *Salmonella* και *Campylobacter* στην οικιακή κουζίνα, αυτά τα είδη απομονώθηκαν από το 17,3% των δειγμάτων (χέρια, και επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα χέρια και τα τρόφιμα). Τα ποσοστά απομόνωσης ήταν υψηλότερα για τα χέρια, σανίδες κοπής και πανιά καθαρισμού (25, 35 και 60%, αντίστοιχα, των δειγμάτων από την επιφάνεια). Μετά την προετοιμασία των κοτόπουλων, οι συμμετέχοντες κλήθηκαν να καθαρίσουν την κουζίνα με κανονικό καθαρισμό ρουτίνας. Η δειγματοληψία των επιφανειών 3 ώρες αργότερα έδειξε ότι το 7% των επιφανειών ήταν ακόμη μολυσμένα με *Salmonella* ή με *Campylobacter*.

Οι Mattick *et al.* (2003) προσδιόρισαν την θερμοκρασία του νερού πλύσιματος πιάτων και την βακτηριακή ποιότητα του νερού, των πετσετών κουζίνας και άλλων επιφανειών μετά την προετοιμασία γευμάτων από ανθρώπους χωρίς κατάρτιση σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων στην κουζίνα τους ή από εξειδικευμένο προσωπικό σε μια εμπορική κουζίνα. Τα *Campylobacter* και *Salmonella*, αντίστοιχα, βρέθηκαν στο 96% και 13% των ωμών κοτόπουλων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των γευμάτων. Στις οικιακές κουζίνες, 2 από τα 45 σφουγγάρια /πανάκια πλύσιματος/συρματάκια και 1 από τα 32 χέρια /πετσέτες κουζίνας ήταν μολυσμένα με *Campylobacter* μετά από το πλύσιμο και τον καθαρισμό. Σε μια άλλη μελέτη από τον Mattick και τους συνεργάτες του, σε μια διαδικασία προσομοίωσης του τυπικού βρετανικού πλύσιμου πιάτων, μολυσμένα από βακτήρια λερωμένα πιάτα πλύθηκαν με ζεστό νερό που περιείχε απορρυπαντικό και εκτιμήθηκε ο κίνδυνος βακτηριακής μεταφοράς σε άλλα πιάτα και σφουγγάρια, επιφάνειες κουζίνας ή τρόφιμα. Μερικά πιάτα παρέμειναν μολυσμένα με βακτήρια μετά το πλύσιμο. Τα βακτήρια *E. coli* και *Salmonella* επέζησαν από το στέγνωμα με τις πετσέτες κουζίνας και το ύφασμα των πετσετών είχε μολυνθεί σε κάθε περίπτωση. Μερικά στείρα πιάτα που πλύθηκαν μετά τα μολυσμένα πιάτα, επίσης μολύνθηκαν. Επίσης, τα σφουγγάρια πλύσιματος συχνά έγιναν μολυσμένα με βακτήρια.

Παρόμοιες περιπτώσεις εμφανίζονται στο λιανικό εμπόριο τροφίμων όπου μεγάλη ποικιλία εξειδικευμένων τροφίμων, όπως τα RTE (ready-to-eat) προϊόντα

πωλούνται συχνά σε καταστήματα εκλεκτών έτοιμων προϊόντων (Delicatessen) και σε fast-food εστιατόρια, όπου συνήθως στην προετοιμασία των γευμάτων χρησιμοποιούνται λεπίδες κοπής από ανοξείδωτο χάλυβα. Τα πιο πιθανά σενάρια διασταυρούμενης επιμόλυνσης σε λιανικό επίπεδο με λιγότερες αναφορές, που αφορούν τον εξοπλισμό και τα σκεύη, όπως επιφάνειες, μαχαίρια και φέτες είναι πιθανό να εμφανιστούν όταν δεν εφαρμόζονται οι ορθές πρακτικές υγιεινής από το προσωπικό.

Ο τεμαχισμός τροφίμων, όπως προϊόντων κρέατος RTE μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο διασταυρούμενης επιμόλυνσης με την επαφή σε μολυσμένες επιφάνειες. Όχι μόνο ο τεμαχισμός, αλλά και οι εργασίες κοπής, χειρισμού ή συσκευασίας συμβάλλουν στην αύξηση του κινδύνου διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Έρευνες κατά τη διάρκεια έξαρσης σαλμονέλλωσης το 1963 επιβεβαίωσε ότι ο φορέας της λοίμωξης ήταν μια κονσέρβα παστού βοδινού (Ash, McKendrick, Robertson, & Hughes, 1964). Η κονσέρβα είχε αρχικά μολυνθεί κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, αλλά ύστερα μόλυνε και τα μηχανήματα κοπής και μετάδωσε τη μόλυνση σε άλλα τρόφιμα RTE.

Ο ρόλος των σακουλών για ψώνια σε συμβάντα διασταυρούμενης επιμόλυνσης έχει επίσης συζητηθεί, με τον κίνδυνο να παρουσιάζεται όταν δεν πλένονται επαρκώς μεταξύ των χρήσεων τους. Για παράδειγμα, όταν ωμά προϊόντα κρέατος και έτοιμα τρόφιμα μεταφέρονται στην ίδια τσάντα, είτε μαζί είτε σε επόμενη χρήση, αυξάνεται η πιθανότητα διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Οι Gerba, Williams και Sinclair (2010) μελέτησαν την πιθανότητα επιμόλυνσης των διαφόρων προϊόντων τροφίμων από επαναχρησιμοποιούμενες σακούλες για ψώνια και παρατήρησαν ότι μεγάλος αριθμός βακτηρίων βρέθηκαν σχεδόν σε όλες τις τσάντες και τα κολοβακτηρίδια στις μισές (*E.coli* ανιχνεύθηκε στο 12% των σακουλών).

Οι επιφάνειες της κουζίνας αποτελούν επίσης ένα σημαντικό κίνδυνο επαναμόλυνσης και διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Redmond & Griffith, 2003). Οι οικιακές επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση των τροφιμογενών παραγόντων όπως το βακτήριο *Salmonella* spp. Κατά συνέπεια, ορισμένες μελέτες για τα υλικά επιφανείας που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο κίνδυνο έχουν υπογραμμίσει το βασικό παράδοξο της επιλογής επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα, δηλαδή ότι τα χαρακτηριστικά που κάνουν μια επιφάνεια "εύκολη να καθαριστεί" μπορούν

επίσης να καταστήσουν πιο πιθανή την απελευθέρωση παθογόνων παραγόντων κατά τη διάρκεια των κοινών πρακτικών παρασκευής τροφίμων (Moore, Blair, & McDowell, 2007).

1.2.5 Σχηματισμός βιοϋμενίου (biofilm) και επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα

Το βιοϋμένιο είναι μια πολύ γνωστή βακτηριακή λειτουργία ανάπτυξης και επιβίωσης, που προστατεύει τα βακτήρια από στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως τις διαδικασίες ξήρανσης και καθαρισμού των επιφανειών, των τροφίμων και του περιβάλλοντος (Reuter, Mallet, Bruce, & van Vliet, 2010). Το παθογόνο *Salmonella* spp. είναι ικανό να προσκολληθεί σε αδρανείς επιφάνειες στον χώρο επεξεργασίας τροφίμων (Hood & Zottola, 1997; Joseph *et al.*, 2001) και κατά συνέπεια, να σχηματίζει βιοϋμένια (Stepanovic, Circovik, Ranin, & Svabic-Vlahovic, 2004). Μόλις ένα βιοϋμένιο σχηματιστεί, γίνεται πηγή μόλυνσης των τροφίμων στις γραμμές επεξεργασίας, το οποίο αποτελεί μια σοβαρή ανησυχία για τη βιομηχανία τροφίμων.

Οι περισσότερες από τις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων στις βιομηχανίες, όπως τα μηχανήματα, οι αγωγοί και οι επιφάνειες εργασίας είναι κατασκευασμένες από ανοξείδωτο χάλυβα. Αυτό το υλικό επιλέγεται παραδοσιακά στην κουζίνα για την προετοιμασία των τροφίμων, λόγω της μηχανικής αντοχής, της αντοχής στη διάβρωση και της ανθεκτικότητας του (Holah & Thorpe, 1990). Τα υπολείμματα των τροφίμων συχνά απομακρύνονται από αυτές τις επιφάνειες, όταν εφαρμόζονται οι ορθές πρακτικές υγιεινής, ωστόσο οι μικροοργανισμοί δεν μπορεί να αφαιρεθούν, εάν δεν εφαρμοστούν οι κατάλληλες διαδικασίες απολύμανσης. Μερικοί συγγραφείς έχουν αναφέρει την παρουσία βιώσιμου *Salmonella* spp. σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα (Kusumaningrum *et al.*, 2003) και άλλα υλικά που βρίσκονται συνήθως σε μονάδες επεξεργασίας, όπως καουτσούκ και πολυουρεθάνη (Chia *et al.*, 2009). Έχουν μελετηθεί διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα προσκόλλησης του *Salmonella* spp. Οι Oliveira *et al.* (2007) πρότειναν ότι η προσκόλληση εξαρτάται έντονα από το στέλεχος και άλλους παράγοντες, όπως η παραγωγή πολυσακχαριτών. Οι Giaouris και Nychas (2006) έδειξαν ότι η αύξηση του επιπέδου κατάλληλων

θρεπτικών ουσιών παρέχει επίσης πιο κατάλληλο περιβάλλον για την προσκόλληση του *S. Enteritidis* PT 4, και επομένως, να ενισχυθεί η δημιουργία βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα.

1.2.6 Μικροβιολογική ποιότητα των περισσευμάτων τροφών (leftovers)

Ένα από τα στάδια υψηλής επικινδυνότητας σε μια οικιακή κουζίνα είναι η αποθήκευση των υπολειμμάτων των τροφίμων. Σε πολλά νοικοκυριά, τα περισσεύματα τροφίμων συντηρούνται στο ψυγείο για μία ή περισσότερες ημέρες και μετά καταναλώνονται, μαγειρευμένα ή όχι καλά. Οι Brinkman *et al.* (1999) μελέτησαν την μικροβιολογική ποιότητα των περισσευμάτων προκειμένου να αποκτήσουν γνώσεις σχετικά με τους μικροβιολογικά κινδύνους που συνδέονται με την συντήρηση σε ψυγείο. 205 περισσεύματα οικιακών νοικοκυριών (αρκετές κατηγορίες προϊόντων, που όλες προετοιμάστηκαν στο σπίτι και οι περισσότερες από αυτές μαγειρεύτηκαν, συντηρήθηκαν σε ψυγεία κυρίως για όχι περισσότερο από 2 ημέρες) εξετάστηκαν μικροβιολογικά μέσα σε 24 ώρες μετά τη συλλογή. Μετά από 3 μέρες αποθήκευσης στους 10 ° C στο εργαστήριο εξετάστηκαν ξανά (χειρότερο σενάριο).

Από τις συνολικές μετρήσεις δειγμάτων αερόβιων μεσόφιλων που πραγματοποιήθηκαν μετρήθηκαν τα *Enterobacteriaceae* και το *Bacillus cereus*. Σε ορισμένα προϊόντα προσδιορίστηκαν οι αριθμοί των *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus*. Επίσης, εφαρμόστηκαν ορισμένα δοκιμαστικά τεστ: αρκετά τρόφιμα μαγειρεύτηκαν, συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και επιμολύνθηκαν τεχνητά με ορισμένα τροφιμογενή παθογόνα (*B. cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* και *S. Aureus*) και στη συνέχεια εξετάστηκαν αμέσως μετά από 3 ημέρες αποθήκευσης στους 10 ° C.

Ήταν ξεκάθαρο ότι πολλοί άνθρωποι αποθήκευαν τα περισσεύματα για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα (περισσότερο από 5 μέρες) και ένα μεγάλο ποσοστό από αυτά έδειξε υψηλές μετρήσεις. Το 7.3 % των δειγμάτων εμφάνισαν περισσότερο από 6 log cfu/g, μερικές φορές ακόμα περισσότερο και από 7 (2.4%).

Συχνά *Enterobacteriaceae* ανιχνεύτηκε σε τρόφιμα που έχουν μαγειρευτεί (10.7%), γεγονός που μας δείχνει ακατάλληλο χειρισμό στα θέματα υγιεινής. Στο 10,7% των δειγμάτων, συχνά σε φαγητά που περιείχαν πατάτες ή λαχανικά, ήταν παρών το *B.Cereus* ($\log \text{ cfu/g} \geq 2.0$). Στο 2% των περισευμάτων ο αριθμός του *B.cereus* ξεπερνούσε ακόμα και το πρότυπο της Ολλανδικής food safety act ($\log \text{ cfu/g} > 5.0$). Αυτά τα δείγματα έδειξαν μεγάλα νούμερα και στις μετρήσεις της ολικής χλωρίδας. Παρόλα αυτά, ο *B. cereus* δεν ήταν συχνά εμφανής σε γεύματα με ρύζι ή ζυμαρικά, που συχνά αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως πηγές τροφιμογενών λοιμώξεων που προκαλούνται από αυτόν τον παθογόνο. Σε κανένα από τα δείγματα δεν εμφανίστηκε *C. perfringens*, *L. Monocytogenes* ή *S. Aureus* ($\log \text{ cfu/g} < 1.0$). Μετά από 3 ημέρες αποθήκευσης στους 10 βαθμούς Κελσίου, οι συνολικές μετρήσεις μεσόφιλων αερόβιων στα τρόφιμα (δείγματα από νοικοκυριά, αλλά και από τρόφιμα τεχνητά μολυσμένα) αυξήθηκαν κατά 2 log μονάδες. Μερικές φορές ήταν εμφανείς μόνο ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί, κάτι που οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση κατά την συντήρηση, 3 λογαριθμικές μονάδες ή και περισσότερο.

Συμπερασματικά, τα περισσεύματα τροφών πρέπει να χειρίζονται σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής, να φυλάσσονται σε καθαρά δοχεία, να ψύχονται άμεσα, να καλύπτονται και στην συνέχεια να συντηρούνται στην ψύξη (4-7° C), όχι όμως παραπάνω από 3 ημέρες. Αν χρειάζεται περαιτέρω συντήρηση, τότε το τρόφιμο θα πρέπει να καταψύχεται.

1.2.7 Η επίδραση του καθαρισμού και της απολύμανσης στην υγιεινή της κουζίνας

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που έρχονται στο σπίτι μέσω μιας μολυσμένης πηγής, όπως μολυσμένο νερό ή ωμά τρόφιμα, από μολυσμένο άτομο ή κατοικίδια ζώα, κ.λπ. μπορούν να εξαπλωθούν στις επιφάνειες των χεριών και του περιβάλλοντος σε σημαντικούς αριθμούς, είτε με άμεση επαφή ή έμμεσα. Αυτοί οι παθογόνοι μπορεί να επιμείνουν στις περιβαλλοντικές επιφάνειες για μεγάλες χρονικές περιόδους και να μεταφερθούν σε άλλες επιφάνειες (συμπεριλαμβανομένων των χεριών) σε επαρκή αριθμό ώστε να αποτελούν κίνδυνο μόλυνσης. Είναι γνωστό ότι, ακόμη και για την υγιή μέλη της οικογένειας, η μολυσματική δόση για μερικούς παθογόνους παράγοντες, ιδιαίτερα των ιών, μπορεί να είναι πολύ μικρή (10-100

βιώσιμων μονάδων ή ακόμα και λιγότερο για κάποιους ιούς) και η μόλυνση μπορεί να προκύψει από την άμεση μεταφορά από τις επιφάνειες μέσω των χεριών ή από την τροφή στο στόμα, τον ρινικό βλεννογόνο και τον επιπεφυκότα. Παρά το γεγονός ότι η μολυσματική δόση για τους εντερικούς παθογόνους όπως το βακτήριο *Salmonella* είναι γενικά υψηλότερη (έως και 10^6 βιώσιμες μονάδες), σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι σχετικά χαμηλή (<100cfu). Για είδη, όπως το *Salmonella*, οι χαμηλοί πληθυσμοί μπορούν να φτάσουν σε υψηλά ποσοστά σε λίγες ώρες με θερμοκρασία δωματίου, αν μεταφερθούν σε άλλα τρόφιμα. Η μεταφορά των βακτηρίων, των μυκήτων και των ιών τριγύρω στο σπίτι μέσω των χεριών και των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα αυξάνει τον κίνδυνο έκθεσης των μελών της οικογένειας, και είναι επομένως σημαντικές οι διαδικασίες υγιεινής για να σπάσουν την αλυσίδα της μετάδοσης λοιμώξεων για αυτές τις επιφάνειες.

Υπάρχουν 3 εναλλακτικές διαδικασίες για την επίτευξη της υγιεινής στις επιφάνειες επαφής των χεριών και των τροφίμων:

A) Καθαρισμός με χρήση απορρυπαντικών (υγρό ή σαπουνι) και ζεστό νερό

Ο καθαρισμός με βάση το απορρυπαντικό θεωρείται επαρκής για να προκαλέσει καθαρή επιφάνεια από άποψη υγιεινής με την προϋπόθεση ότι το ξέπλυμα εφαρμόζεται σχολαστικά. Η πρακτική δυνατότητα να ξεπλυθεί μια επιφάνεια από μικρόβια με τρεχούμενο, καλής ποιότητας (π.χ. πόσιμο) και κατά προτίμηση ζεστό νερό είναι μείζονος σημασίας για την επίτευξη υγιεινής με απορρυπαντικό και νερό. Η μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων, που επιτυγχάνεται με καθαρισμό που έχει ως βάση το απορρυπαντικό, ποικίλλει ανάλογα με τη φύση της επιφάνειας (υλικό και τραχύτητα επιφάνειας) και ο τρόπος εφαρμογής της, αλλά γενικά είναι μεταξύ 0,5 και 3 λογαρίθμων (log).

B) Καθαρισμός με χρήση σαπουνιού ή απορρυπαντικού, που ακολουθείται από την εφαρμογή απολυμαντικού προϊόντος

Τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη μιας υγιεινής επιφάνειας, θα πρέπει να έχουν ταχεία μικροβιοκτόνα δράση κατά των βακτηρίων, ιών ή

παθογόνων μυκήτων υπό κατάλληλες συνθήκες για την προοριζόμενη χρήση τους (παρουσία του εδάφους, θερμοκρασία, σκληρότητα νερού κλπ). Παρά το γεγονός ότι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τυποποιημένες δειγματοληψίες του αιωρήματος και της επιφάνειας για να αποδειχθεί ότι ένα προϊόν έχει ένα συγκεκριμένο προφίλ δραστηριότητας (φάσμα δράσης, ποσοστό θανάτωσης, κλπ), δεν παρέχουν ένδειξη της αποτελεσματικότητας σύμφωνα με τις συνθήκες χρήσης π.χ. όταν χρησιμοποιείται από μια οικογένεια στο σπίτι, ιδίως σε σχέση με τη γνώση τους για την ορθή υγιεινή πρακτική. Σε γενικές γραμμές, οι μελέτες που υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η χρήση του απολυμαντικού με ένα συγκεκριμένο τρόπο, σε καταστάσεις όπου υπάρχει σημαντικός κίνδυνος μεταφοράς των μολυσματικών παραγόντων, προκαλεί μεγαλύτερη μείωση του μικροβιακού κινδύνου σε σχέση με αυτήν που επιτυγχάνεται με την εφαρμογή μόνο καθαρισμού που έχει ως βάση το απορρυπαντικό.

Γ) Συνδυασμός καθαρισμού και απολύμανσης

Στο νοσοκομείο και στην βιομηχανία παρασκευής τροφίμων, δεδομένου ότι τα απολυμαντικά χάνουν την επίδραση τους σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό από την παρουσία ακαθαρσιών, οι επιφάνειες πρέπει να καθαρίζονται πριν από την εφαρμογή του απολυμαντικού. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για πολύ λερωμένες επιφάνειες, π.χ., επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα. Στην οικία, αυτό θεωρείται λιγότερο σημαντικό για επιφάνειες όπως τις πόρτες και τις λαβές της βρύσης όπου η βρωμιά είναι ελάχιστη. Δεδομένου ότι ο χρόνος που διατίθεται για τον καθαρισμό στο σπίτι είναι συχνά περιορισμένος, η χρήση ενός συνδυασμού καθαριστικό-απολυμαντικό μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητική σε αυτή την περίπτωση. Μια περιορισμένη μελέτη σε χώρο εστίασης (catering) δεν έδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ του επιπέδου της διασφάλισης υγιεινής που επιτεύχθηκε σε επιφάνειες, χρησιμοποιώντας είτε τον συνδυασμό απορρυπαντικού και απολυμαντικού (απολυμαντικό ενεργού χλωρίου ή τεταρτοταγούς αμμωνίου), είτε την 2-στάδιων διαδικασία καθαρισμού και απολύμανσης (Stekelenburg and Hartog).

Οι Cogan *et al.* (1999) ανέφεραν μια μελέτη σε 60 σπίτια σχετικά με την προετοιμασία γεύματος με μολυσμένα κοτόπουλα είτε με *Salmonella*, είτε με

Campylobacter. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σημαντική επιμόλυνση μεταφέρθηκε στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με χέρια και τρόφιμα, με ένα συνολικό 17,3% των δειγμάτων της επιφάνειας να δείχνουν την ύπαρξη του στελέχους-στόχου. Όταν στους συμμετέχοντες δόθηκαν οδηγίες να καθαρίσουν πριν τη δειγματοληψία με μια τυπική διαδικασία που βασίζεται στην χρήση απορρυπαντικού (σε bowl πλύσιμου πιάτων), δεν υπήρχε μείωση στη συχνότητα των επιμολύνσεων. Η συχνότητα εμφάνισης της μόλυνσης στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με χέρια και τρόφιμα παρέμεινε στο 16% (1 μολυσμένη τοποθεσία για κάθε 6,25 τοποθεσίες). Αντίθετα, όταν εφαρμόστηκε απολύμανση με υποχλωριώδες διάλυμα (5000ppm Cl₂) μαζί με ο καθαρισμό με βάση το απορρυπαντικό, υπήρξε μια σημαντική μείωση του μικροβιακού κινδύνου στο 2,3% (όχι περισσότερη από 1 μολυσμένη τοποθεσία για κάθε 33 τοποθεσίες).

Οι Barker *et al.* (2003) δημιούργησαν ένα εργαστηριακό μοντέλο κουζίνας για να συγκρίνουν την αποτελεσματικότητα των διαδικασιών για τη μείωση των κινδύνων από διασταυρούμενη επιμόλυνση κατά το χειρισμό των τροφίμων. Οι δύο διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο καθαρισμός με βάση το απορρυπαντικό και η απολύμανση. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι, κατά τη διάρκεια του χειρισμού των τεχνητά μολυσμένων με *Salmonella enteritidis* PT4 κοτόπουλων, ο μικροοργανισμός μεταδόθηκε ευρέως στα χέρια, τα πανιά, και τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με χέρια και τρόφιμα (hand and food contact surfaces). Σε αυτή τη μελέτη, οι διαδικασίες υγιεινής αξιολογήθηκαν με βάση την ικανότητά τους να μειώσουν τον αριθμό των κυττάρων *Salmonella* που ανακτήθηκαν έως <1 cfu. Παρόλο που ο καθαρισμός με βάση το απορρυπαντικό, πραγματοποιώντας τυπικό πλύσιμο χωρίς ξέβγαλμα, είχε ως αποτέλεσμα κάποια μείωση του κινδύνου (από το 100%, στο 61,4% των μολυσμένων επιφανειών), ήταν ανεπαρκής για να αποκαταστήσει αποτελεσματικά τις επιφάνειες σε μια υγιεινή κατάσταση. Με το συνδυασμό καθαρισμού με βάση το απορρυπαντικό με μετέπειτα διαδικασία έκπλυσης ή με διάλυμα υποχλωριώδους στα 500ppm (του διαθέσιμο χλωρίου) επιτεύχθηκε κάποια περαιτέρω μείωση του μικροβιακού κινδύνου, αλλά δεν κρίθηκε ικανοποιητικό για τους σκοπούς της υγιεινής των τροφίμων. Αντίθετα, η μείωση του κινδύνου που επιτεύχθηκε από το διάλυμα υποχλωριώδους στα 5000ppm ήταν ιδιαίτερα σημαντική και αρκετή για να μειώσει τον αριθμό των μολυσμένων επιφανειών σε 2,9%.

Εν κατακλείδι, η επιλογή της κατάλληλης διαδικασίας για τον υγιεινό καθαρισμό των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με χέρια και τρόφιμα εξαρτάται από την κάθε περίπτωση, πιο συγκεκριμένα από την ικανότητα της εξασφάλισης ότι η επιφάνεια έχει ξεπλυθεί επιμελώς για την αφαίρεση των μολυσματικών παραγόντων. Εκτιμώντας ότι με τον καθαρισμό, σε επιφάνειες που δεν μπορούν να ξεπλυθούν, αφαιρείται ένα σημαντικό ποσοστό της μικροβιακής μόλυνσης (έως 90-99%), όπου τα παθογόνα είναι παρόντα, αυτό το γεγονός μπορεί να αφήσει ένα επαρκές επίπεδο μόλυνσης για να επιτρέψει την έκθεση σε μια μολυσματική δόση. Με βάση τα στοιχεία και τις έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, όπου είναι δυνατό το ξέπλυμα με άφθονο τρεχούμενο, πόσιμο και κατά προτίμηση ζεστό νερό, η υγιεινή των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με χέρια και τρόφιμα μπορεί να επιτευχθεί με καθαρισμό που βασίζεται στο απορρυπαντικό, ακολουθούμενη από έκπλυση και ξήρανση. Τα στοιχεία από εργαστηριακές και in-vivo μελέτες δείχνουν ότι η χρήση απολυμαντικών ουσιών με συγκεκριμένο τρόπο μπορεί να φέρει σημαντικά μεγαλύτερη μείωση στην συχνότητα εμφάνισης μολυσμένων επιφανειών από εκείνη που επιτυγχάνεται με τον καθαρισμό που βασίζεται στο απορρυπαντικό. Η χρήση απολυμαντικού επιπρόσθετα (ή σε συνδυασμό) με τον καθαρισμό, ώστε να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη ασφάλεια θεωρείται σκόπιμη σε περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η μηχανική δράση και η σχολαστική έκπλυση των επιφανειών με ασφαλές νερό. Ειδικότερα, η χρήση απολυμαντικού θεωρείται σημαντική, όταν η αποτυχία επίτευξης της υγιεινής με σαπούνι και νερό είναι ένα πραγματικό ενδεχόμενο και μπορεί να επιφέρει υψηλότερο κίνδυνο σοβαρών συνεπειών. Το IFH (International Scientific Forum on Home Hygiene) αναγνωρίζει ότι η αποτελεσματικότητα των διαδικασιών καθαρισμού και απολύμανσης μπορεί να επηρεαστεί εάν το απολυμαντικό προϊόν δεν χρησιμοποιείται στη σωστή αραίωση και με τον σωστό τρόπο. Δεδομένου ότι, υπό τις συνθήκες χρήσης, τα αποτελέσματα της εφαρμογής μιας διαδικασίας υγιεινής είναι σχετικά βραχύβια, ο χρόνος εφαρμογής είναι σημαντικός.

1.2.7.1 Διαδικασίες επίτευξη υγιεινής στα μέσα καθαρισμού (σφουγγάρια, πανιά κ.α.)

Όταν χρησιμοποιούνται σωστά, τα πανιά καθαρισμού και τα σφουγγάρια, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για την υγιεινή καθώς βοηθούν στην αποκόλληση των σωματιδίων από τις επιφάνειες και μπορούν να αφαιρέσουν ένα σημαντικό ποσοστό βρωμιάς και μικροβίων που βρίσκονται στην επιφάνεια. Ωστόσο, δεδομένου ότι συχνά παραμένουν υγρά για μεγάλες χρονικές περιόδους και συνήθως περιέχουν κάποια υπολείμματα ακαθαρσιών, προσφέρουν ιδανικές συνθήκες για την επιβίωση και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ιδιαίτερα, όταν χρησιμοποιούνται διαδοχικά σε διάφορες επιφάνειες, μπορούν να «σηκώσουν» μολυσματικούς παράγοντες από μια επιφάνεια και να την επανατοποθετήσουν σε μια άλλη. Από τη φύση της λειτουργίας τους, αντιπροσωπεύουν έναν σοβαρό κίνδυνο στα πλαίσια της δυνατότητάς τους να αυξήσουν την έκθεση των μελών της οικογένειας σε επιβλαβή μικρόβια. Οι διαδικασίες υγιεινής που εφαρμόζονται στα μέσα καθαρισμού της κουζίνας έχουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της εξάπλωσης των μικροοργανισμών, μέσω των επιφανειών, στο σπίτι.

Για τον καθαρισμό τους, ο καθαρισμός με απορρυπαντικό είναι ανεπαρκής για την εξάλειψη των μικροβιολογικών κινδύνων, ιδίως όταν είναι πολύ μολυσμένα. Υπάρχουν 3 εναλλακτικές διαδικασίες για την επίτευξη της υγιεινής των μέσων καθαρισμού:

- Έκπλυση με απορρυπαντικό και ζεστό νερό που ακολουθείται από εμβάπτιση σε νερό με 90 ° C ή περισσότερο για 2 λεπτά.
- Έκπλυση με απορρυπαντικό και ζεστό νερό που ακολουθείται από πλυσίματα στο πλυντήριο με ελάχιστη θερμοκρασία των 60 ° C.
- Ξέπλυμα με απορρυπαντικό και ζεστό νερό που ακολουθείται από την εφαρμογή απολυμαντικού.

1.3 ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΠΡΟΜΑΓΕΙΡΕΥΜΕΝΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΤΟ ΠΛΥΣΙΜΟ ΣΚΕΥΩΝ ΚΟΥΖΙΝΑΣ

1.3.1 Μέσα πλύσιμου σκευών κουζίνας και μικροβιολογική μόλυνση

Οι σπόγγοι κουζίνας επιφυλάσσουν μικροβιολογικούς κινδύνους, επειδή μπορούν να παραμείνουν υγροί και να χρησιμεύουν ως δεξαμενές και μέσα μεταφοράς για τροφιμογενείς παθογόνους παράγοντες, για να προκαλέσουν ασθένειες.

Κατά τη διαδικασία καθαρισμού του εξοπλισμού, των σκευών, του νεροχύτη, κλπ. στην κουζίνα, το πλύσιμο γίνεται με τη χρήση σφουγγαριών για την εξάλειψη των κατάλοιπων τροφίμων. Σαν συνέπεια αυτής της διαδικασίας, μέρος των υπολειμμάτων από τα τρόφιμα παραμένει στην επιφάνεια του σπόγγου. Αυτά τα υπολείμματα τροφίμων σε συνδυασμό με την υγρασία που διατηρείται στα σφουγγάρια προσφέρουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Μια περιορισμένη έρευνα σε σπίτια καταναλωτών έδειξε ότι, κατά μέσο όρο, οι καταναλωτές του Ηνωμένου Βασιλείου χρησιμοποιούν ένα διάλυμα απορρυπαντικού 0,12% στο νεροχύτη και μετά το τέλος ενός συνηθισμένου πλυσίματος, το λερωμένο νερό από το πλύσιμο περιέχει 0,4% w/v οργανικής ουσίας. Δεν υπήρχαν σαπουνάδες στην επιφάνεια του νερού πλυσίματος που να περιείχαν $\geq 2.4\%$ (w/v) συγκέντρωσης οργανικής ύλης και τυπικού απορρυπαντικού. Η μέση θερμοκρασία του νερού πλυσίματος στο Ηνωμένο Βασίλειο, είναι αρχικά 48° C, όπως και στις περισσότερες χώρες της Βόρειας Ευρώπης. Όμως μειώνεται μερικούς βαθμούς κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του πλυσίματος των πιάτων.

Οι πρώτες μελέτες για την βακτηριακή μόλυνση στην κουζίνα έγιναν στα τέλη της δεκαετίας του 1960 διερευνώντας το μικροβιακό φορτίο των πετσετών και τις συνθήκες υγιεινής των πανιών για το πλύσιμο των πιάτων (dishcloths). Τέτοια πανιά ήταν μολυσμένα σε μεγάλο βαθμό με βακτήρια και θεωρήθηκαν ύποπτα ως από τους κύριους φορείς για τη διάδοση των βακτηρίων στην κουζίνα (Speirs *et al.*, 1995). Τα σφουγγάρια και τα πανάκια πλυσίματος έχουν αναγνωριστεί ως πιθανοί παράγοντες για την εξάπλωση των μικροοργανισμών, και έχει παρατηρηθεί ότι τα

βακτήρια εξακολουθούν να υπάρχουν σε αυτά τα «μέσα μεταφοράς» (Josephson *et al.*, 1997; Scott and Bloomfield, 1990; Speirs *et al.*, 1995). Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι διάφορα βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Salmonella* spp., επιβιώνουν στα χέρια, στα σφουγγάρια/πανιά, στα σκεύη και παραμένουν για ώρες ή και μέρες μετά την αρχική τους επαφή με τους μικροοργανισμούς (Jiang and Doyle, 1999; Kusumaningrum *et al.*, 2002). Σε δύο μελέτες, απομονώθηκε *Salmonella* spp. από το 13,8% των πανιών για πλύσιμο και από το 15,4% των σφουγγαριών που πάρθηκαν από νοικοκυριά των ΗΠΑ (Enriquez *et al.*, 1997), ενώ το *S. aureus* βρέθηκε στο 4% των πανιών τύπου-σφουγγάρι (Hilton & Austin, 2000). Σε μια μελέτη από δέκα κουζίνες στις ΗΠΑ, 33% και 67% των σφουγγαριών βρέθηκαν θετικά για *E. coli* και κολοβακτηρίδια αντίστοιχα (Josephson, Rubino, & Pepper, 1997).

Τα απορρυπαντικά είναι άλατα ενώσεων, γνωστά ως λιπαρά οξέα. Ένα μόριο απορρυπαντικού αποτελείται από μια μακρά αλυσίδα υδρογονανθράκων (που αποτελείται από άνθρακα και υδρογόνα) με μια καρβοξυλική όξινη ομάδα στην μια άκρη η οποία είναι ιοντικά συνδεδεμένη με ένα ιόν μετάλλου, συνήθως νάτριο ή κάλιο. Η μία άκρη με τους υδρογονάνθρακες είναι μη-πολική και είναι διαλυτή σε μη-πολικές ουσίες (όπως λίπη και έλαια), και η ιοντική άκρη (το άλας του καρβοξυλικού οξέος) είναι διαλυτή στο νερό. Όταν λίπη ή έλαια (μη-πολικοί υδρογονάνθρακες) αναμιχθούν σε ένα διάλυμα απορρυπαντικό-νερό, τα μόρια του απορρυπαντικού λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ πολικών μορίων του νερού και μη-πολικών μορίων των λιπών. Αφού τα μόρια του έχουν διπλή ιδιότητα, μη-πολικά και πολικά μόρια μπορεί να λειτουργήσει ως γαλακτωματοποιητής, προκαλώντας εναιώρημα με τα λίπη, με τέτοιο τρόπο ώστε να μπορούν να αφαιρεθούν κατά το πλύσιμο. Το απορρυπαντικό θα σχηματίσει κολλοειδή συσσωματώματα (*micelles*), όπου μέσα τους θα παγιδεύσει τα λίπη (David A. Katz, 2000). Τα απορρυπαντικά και τα υγρά πλυσίματος πιάτων είναι αντιβακτηριδιακά προϊόντα και κατασκευάζονται συγκεκριμένα για τη μείωση των βακτηρίων στα σφουγγάρια και τα πανιά καθαρισμού. Σε μελέτη έγινε φανερή η παρουσία των διαφόρων ειδών μικροοργανισμών σε σφουγγάρια κουζίνας (Özlem ERDOĞRUL *et al.*, 2006). Επιπλέον διερευνήθηκε η επίδραση του συνηθισμένου υγρού πιάτων σε στελέχη των *Escherichia coli* και *Salmonella Typhimurium* υπό εργαστηριακές συνθήκες σε σφουγγάρια κουζίνας, με ή χωρίς υπολείμματα τροφών. Η καθημερινή εφαρμογή του υγρού πιάτων σε σφουγγάρια δεν είχε καμία επίδραση στον πληθυσμό των ζυμών και

της μούχλας, των ψευδομονάδων και του *E. coli*. Αλλά ο αριθμός των *Salmonella* spp. μειώθηκε. Το παθογόνο *S. aureus* δεν ανιχνεύθηκε στα σφουγγάρια από τα νοικοκυριά μετά από 10 ημέρες, ενώ τα *Pseudomonas* ήταν ο κυρίαρχος μικροοργανισμός στις 10 ημέρες. Επιπλέον, ερευνήθηκαν τα ποσοστά των παθογόνων από τεχνητά μολυσμένα σφουγγάρια. Σχετικά με τους μικροοργανισμούς που εφαρμόστηκαν, το *S. typhimurium* μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης εντός 24 ωρών. Με το ποσό του υγρού πλυσίματος των πιάτων που προστέθηκε στα σφουγγάρια ($3\% \pm 1,5\%$), το βακτήριο *E. coli* μειώθηκε στις 24 ώρες, με ή χωρίς εμπορικό αποστειρωμένο γάλα(10%), παρουσιάζοντας όμως καλύτερη επιβίωση στις δύο ημέρες στα σφουγγάρια με την παρουσία του αιωρήματος γάλακτος. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και η έρευνα των Kusumaningrum *et al.*, (2001), όπου τα απορρυπαντικά που εφαρμόστηκαν ήταν πιο αποτελεσματικά στους πληθυσμούς των «εργαστηριακών» βακτηρίων που εμβολιάστηκαν σε καινούργια σφουγγάρια, παρά στους πληθυσμούς που πραγματικά συναντιούνται σε οικίες καταναλωτών σε ήδη μεταχειρισμένα σφουγγάρια. Όλοι οι μικροοργανισμοί που εμβολιάστηκαν στους καινούργιους σπόγγους παρουσίασαν ταχεία αύξηση σε εργαστηριακές συνθήκες, εκτός των *S. aureus* και *B. cereus* που μειώθηκαν σε πληθυσμό κάτω από το όριο ανίχνευσης εξαιτίας των χαμηλών συγκεντρώσεων των απορρυπαντικών για πλύσιμο πιάτων. Τα *E. coli* και *Salmonella* διατήρησαν τους πληθυσμούς τους έως είκοσι τέσσερις ώρες μετά την έκθεση τους στα απορρυπαντικά. Μετά από τις 24 ώρες οι πληθυσμοί όλων των βακτηρίων άρχισαν να μειώνονται.

Σε μια μελέτη των Mattick *et al.*,(2003) ελέγχθηκε η επιβίωση του *Campylobacter*, του *E. coli* και του *Salmonella*. Η μελέτη έλεγξε μεταβλητές όπως την σκληρότητα του νερού, την χρήση απορρυπαντικών και την επιβίωση τους κατά το στέγνωμα. Τα πιάτα μολύνθηκαν με βακτήρια και μετά πλύθηκαν σε ένα μπολ με ζεστό νερό και απορρυπαντικό. Επίσης ελέγχθηκε η πιθανότητα διασταυρούμενης επιμόλυνσης σε αποστειρωμένα πιάτα, σπόγγους, πάγκους και αντικείμενα που ήρθαν σε επαφή με επιφάνειες με μολυσμένο νερό. Κατά μεγάλο ποσοστό το βακτήριο *Salmonella* επιβίωσε από το στέγνωμα των πιάτων με πετσέτα ή με τον αέρα. Και κατά το στέγνωμα τους με πετσέτα τις περισσότερες φορές οι μολυσματικοί παράγοντες μεταφερόταν στην πετσέτα. Επίσης, προέκυψε ότι οι παθογόνοι μεταφέρονταν στα αποστειρωμένα πιάτα από τα μολυσμένα και σε επόμενο στάδιο ήταν εφικτό να μεταφερθούν στα τρόφιμα, κυρίως με την επίδραση βάρους στην επαφή του προσομοιωμένου τροφίμου με το μολυσμένο πιάτο. Η μεταφορά των

μολυσματικών παραγόντων στα σφουγγάρια, όμως ήταν ένα φαινόμενο με μεγαλύτερη συχνότητα. Η έρευνα έδειξε πως είναι πιθανή η μεταφορά της μόλυνσης από το σφουγγάρι στον πάγκο εργασίας της κουζίνας και τα πιάτα.

Σφουγγάρια μολυσμένα με *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Campylobacter jejuni* είχαν την ικανότητα να μεταφέρουν παθογόνους στις επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, όπου ο *S. aureus* επέζησε για 4 ημέρες. Ομοίως, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που μεταφέρθηκαν από τα σφουγγάρια σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, ακολούθως μεταφέρθηκαν σε κομμένα λαχανικά με διάφορα ποσοστά (Kusumaningrum *et al.*, 2003).

Όσον αφορά τις συνήθειες κατά το πλύσιμο των πιάτων, μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Stamminger *et al.*, (2007) σε Ευρωπαίους καταναλωτές έδειξε ότι περίπου 30% των συμμετεχόντων έπλεναν μόνο κάτω από συνεχώς τρεχούμενο νερό βρύσης. Το υπόλοιπο ποσοστό συνήθως έπλεναν σε νεροχύτη ή λεκάνη. Παραδόξως, το ποσό του αφρού ήταν μικρής σημασίας στην απόφαση τους να αντικαταστήσουν το νερό. Σχεδόν το 30% των εθελοντών απάντησαν ότι δεν κάνουν στα πλυμένα αντικείμενα ένα τελικό ξέβγαλμα με καθαρό νερό. Όσο για μέσα πλυσίματος, τα σφουγγάρια χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο, αλλά και οι βούρτσες και οι πετσέτες φαίνεται να χρησιμοποιούνται ευρέως. Στην ερώτηση για το πόσο συχνά πλένουν τα σκεύη με το χέρι, το 50% των εθελοντών απάντησαν πριν ή μετά από κάθε γεύμα, ενώ το άλλο 50% είπαν ότι πλένουν το πολύ δύο φορές την ημέρα. Αυτό δείχνει σαφώς ότι υπάρχουν είναι δύο διαφορετικές νοοτροπίες: μερικοί άνθρωποι θέλουν να έχουν ένα άδαιο νεροχύτη, και να πλένουν όταν υπάρχουν αντικείμενα να πλυθούν και άλλοι άνθρωποι που συσσωρεύουν τα χρησιμοποιημένα σκεύη μέχρι να φτάσει η ώρα να πλυθούν.

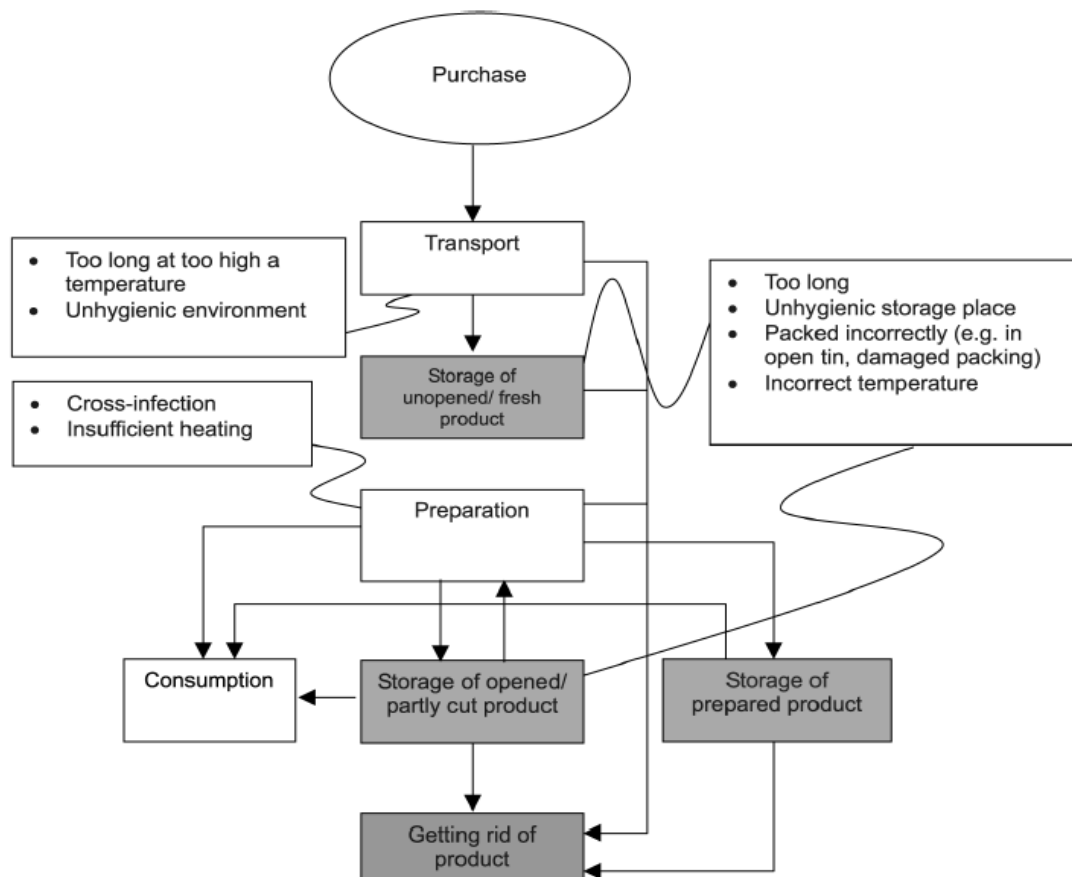
Σε μελέτη των Jaesung Lee *et al.*, (2006) που αφορούσε την επίδραση του πλυσίματος σε μολυσμένα σκεύη κουζίνας με 4 διαφορετικά είδη τροφίμων που είχαν ενοφθαλμιστεί με παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι περισσότεροι χειρισμοί έδειξαν την ικανότητα να προκαλέσουν μείωση κατά 5 λογαρίθμους του μικροβιακού φορτίου. Στις περιπτώσεις των χειρότερων σεναρίων η 5-log μείωση να είναι δύσκολο να επιτευχθεί δεδομένου ότι θα μπορούσε να είναι δύσκολο να αφαιρεθούν με φυσικό τρόπο κάποια υπολείμματα τροφίμων από ορισμένα σκεύη φαγητού, όπως και αν τα αφήναμε να στεγνώσουν πάνω στα σκεύη περισσότερο από μια ώρα. Το φυσικό τρίψιμο κατά το πλύσιμο μπορεί επίσης να επηρεάσει η απομάκρυνση των

σωματιδίων των τροφίμων και, επομένως, την παρουσία των μικροοργανισμών στα σκεύη. Η οργανική ύλη, όπως τα υπολείμματα τροφίμων, είναι γνωστό ότι προστατεύουν τα βακτήρια από την άμεση επαφή με τη θερμότητα ή τα απορρυπαντικά πιάτων που χρησιμοποιούνται κατά το πλύσιμο των σκευών κουζίνας (Kusumaningrum *et al.*, 2002; Line *et al.*, 1991). Πράγματι, τα υπολείμματα τροφίμων που έχουν παραμείνει σε πλυντήρια πιάτων μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως θρεπτικές ουσίες για βακτήρια και μπορούν να μολύνουν και άλλα σκεύη που θα τοποθετηθούν στο πλυντήριο (Stahl Wernersson, Johansson, & Hakanson, 2004a).

1.3.2 Χειρισμός προμαγειρευμένων τροφίμων

Αρκετές διεθνείς μελέτες υπέδειξαν πως ένα σημαντικό ποσοστό τροφιμογενών λοιμώξεων προκύπτει από μη ασφαλείς πρακτικές επεξεργασίας των τροφίμων στην οικία (Scott *et al.*, 1982; Scott, 1996; WHO, 2000). Η ανάλυση στο ξέσπασμα μιας εντερικής λοίμωξης την περίοδο 1998-2000 στην Νέα Ζηλανδία έδειξε πως το 39.3% των κρουσμάτων προκλήθηκε από οικίες, ενώ το 11.9% από αυτά οφειλόταν σε λανθασμένο χειρισμό τροφίμων (Lake and Simmons, 2001) (Εικόνα 1.6). Η ανεπαρκής συντήρηση ή κατάψυξη, η ανεπαρκής αποθήκευση, η διασταυρούμενη επιμόλυνση, οι κακές πρακτικές υγιεινής, αναγνωρίστηκαν ως κύριοι παράγοντες που βοήθησαν στην εξάπλωση της λοίμωξης (Bryan, 1988; Gorman *et al.*, 2002; Perera, 2006). Επίσης, τα αποτελέσματα μιας συστηματικής μελέτης της ασφάλειας των τροφίμων έδειξε πως οι καταναλωτές συχνά πραγματοποιούν λανθασμένους χειρισμούς κατά την παρασκευή του φαγητού στο σπίτι (Redmond & Griffith, 2003).

Οι καταναλωτές συχνά αναμένεται να είναι υπεύθυνοι για τις κατάλληλες πρακτικές επεξεργασίας τροφίμων που περιλαμβάνουν την αποθήκευση και την προετοιμασία των τροφίμων στην οικία. Παρόλα αυτά, αναφέρεται πως συχνά πως οι καταναλωτές δεν γνωρίζουν τον ρόλο που μπορούν να διαδραματίσουν στην πρόληψη τροφιμογενών λοιμώξεων (Byrd-Bredbenner *et al.*, 2007) και υποτιμούν την επικινδυνότητα των συνεπειών αυτών των λοιμώξεων.



Εικόνα 1.6 : Διαχείριση τροφίμων και επικινδυνότητα κατά την προετοιμασία τροφίμων στην οικία (Terpstra *et al.*, 2005).

Η δυσκολία των καταναλωτών να συσχετίσουν τις πρακτικές χειρισμού των τροφίμων με τροφιμογενείς λοιμώξεις, θεωρείται ως σοβαρό εμπόδιο για να πειστούν να αλλάξουν τις ακατάλληλες πρακτικές (Parry, Miles, Tridente, Palmer, & South and East Wales Infectious Disease Group, 2004). Αποτελέσματα από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο και την Αυστραλία, έδειξαν πως οι περισσότεροι καταναλωτές δεν ακολουθούν τις κατευθυντήριες οδηγίες για την αποφυγή τροφιμογενών λοιμώξεων, όπως την διατήρηση τροφίμων υψηλής επικινδυνότητας στους 4 ή και σε λιγότερους βαθμούς Κελσίου, τον διαχωρισμό των τροφίμων από αυτά που είναι έτοιμα προς κατανάλωση κατά την συντήρηση, ή την κατάλληλη απόψυξη κατεψυγμένων τροφίμων (Worsfold & Griffith, 1997b; Jay *et al.*, 1999a). Οι περισσότεροι καταναλωτές γνωρίζουν ότι ένα ψυγείο παρατείνει τη διάρκεια ζωής των τροφίμων και διατηρεί τα τρόφιμα ασφαλή. Ωστόσο, προκειμένου να επιτευχθούν οι θετικές επιπτώσεις και να εμποδίσει την ανάπτυξη των *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* και του

Bacillus cereus, ένα ψυγείο πρέπει να λειτουργεί σωστά για να διατηρεί τη θερμοκρασία κάτω από τους 5° C (Jay *et al*, 1999a; Medeiros *et al*, 2001a; Brown, 2000:130; Rosset, 2001). Για την επίτευξη κατάλληλης ψύξης, έχει προταθεί ότι τα τρόφιμα θα πρέπει να χωρίζονται σε μικρότερες ποσότητες και να τοποθετούνται σε ρηγά δοχείο (Farber JM & Hughes A., 1995). Μελέτες έχουν δείξει ότι πολύ λίγοι άνθρωποι γνώριζαν την ακριβή θερμοκρασία στην οποία τα κατεψυγμένα τρόφιμα πρέπει να διατηρούνται (13%) και κατά μέσο όρο μόνο 30% γνώριζαν τη σωστή θερμοκρασία που πρέπει να έχει ένα ψυγείο.

Η συντήρηση των προϊόντων διατροφής πάνω από τη θερμοκρασία ψύξης και κάτω από τη συνιστώμενη θερμοκρασία των 63°C κατά την διατήρηση σε θερμότητα (Department of Health. Guidance on the Food Safety, London: Department of Health, 1995) ενθαρρύνει την διάδοση των βακτηριακών κυττάρων, την βλάστηση των σπορίων και την πιθανή παραγωγή τοξινών σε πιθανά επικίνδυνα επίπεδα. Ο ανεπαρκής έλεγχος της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της συντήρησης συχνά φέρεται ως αιτία τροφικών ασθενειών. Αποτελέσματα πειραμάτων που κατέδειξαν την ευκολία με την μικροοργανισμοί που έχουν μεταφερθεί, μπορούν να αναπτυχθούν σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. (Bradford MA, Humphrey TJ, & Lappin-Scott HM., 1997).

Ο χειρισμός των τροφίμων που έχουν περισσέψει (leftovers) αποτελεί ένα ακόμη υψηλό κίνδυνο σε μια οικιακή κουζίνα (Beumer and Kusumaningrum, 2003). Οι Brinkman *et al*. (1999) βρήκαν ότι το 7,3% των δειγμάτων από περισσεύματα που συλλέχθηκαν από κουζίνες οικιακής χρήσης παρουσίασαν υψηλούς πληθυσμούς βακτηρίων (>10⁶ cfu/g). Τα βακτήρια που βρέθηκαν στα δείγματα αυτά περιλάμβαναν *Enterobacteriaceae* και *Bacillus cereus*. Η μικροβιολογική κατευθυντήρια οδηγία για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, όπως τα μαγειρεμένα κοτόπουλα, όπως υποδεικνύεται από το Κώδικα Ορθής Πρακτικής για χώρους εστίασης στη Βρετανία είναι <10³ cfu/g (Worsfold & Griffith, 1995). Οι Beumer και Kusumaningrum (2003) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα υπολείμματα πρέπει να χειρίζονται στα πλαίσια της υγιεινής, να διατηρούνται σε καθαρά δοχεία και να ψύχονται το συντομότερο δυνατό. Αφήνοντας τα τρόφιμα να κρυώσουν, πριν την ψύξη τους στο ψυγείο σε θερμοκρασία δωματίου, τα εκθέτει για άγνωστη χρονική περίοδο στην επικίνδυνη ζώνη θερμοκρασίας από 5° C έως 60° C (Knabel, 1995; Brown, 2000). Σύμφωνα με τον Brown (2000), η ακατάλληλη ψύξη των

προετοιμασμένων τροφίμων συμβάλλει συχνά σε κρούσματα τροφιμογενών νόσων. Όταν αναθερμαίνονται τα προηγουμένως μαγειρεμένα τρόφιμα, πρέπει να επιτευχθούν οι ίδιες υψηλές θερμοκρασίες όπως το αρχικό μαγείρεμα, αφού κακές πρακτικές συντήρησης μπορεί να έχουν οδηγήσει στον σχηματισμό μεγάλου αριθμού βακτηρίων στο μαγειρεμένο φαγητό (Worsfold, 1995).

Σε μελέτη του *British Food Journal* (M.J. Terpstra *et al.*, 2005) οι μισοί από τους ερωτηθέντες είχαν περισσεύματα στα ψυγεία τους τη στιγμή της συνέντευξης. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, τα περισσεύματα μπορούν να φυλάσσονται για δύο ημέρες, και τα προετοιμασμένα τρόφιμα κρέατος για δύο έως τρεις ημέρες. Σχεδόν οι μισοί από τους ερωτηθέντες (επτά από τους 17) συντηρούσαν τα τρόφιμα περισσότερο από ό, τι αναφέρεται στις κατευθυντήριες οδηγίες. Οι ερωτηθέντες όταν απόρριπταν τα περισσεύματα, ήταν λόγω είτε της μυρωδιάς, της εμφάνισης ή των πολλών ημερών στην συντήρηση. Σύμφωνα με περισσότερο από τα 2/3 (πέντε από τους εννέα) των ερωτηθέντων, τα περισσεύματα μπορούν να διατηρούνται περισσότερο από ό, τι ορίζεται στις κατευθυντήριες οδηγίες. Ιδιαίτερα, οι ηλικιωμένοι δεν είχαν γνώσεις για τους χρόνους συντήρησης.

Σε μια άλλη έρευνα, είκοσι από τους 36 (56%) των ερωτηθέντων που προετοίμασαν ρολό κιμά, αποθήκευσαν τα περισσεύματα σε ξεχωριστό σκεύος, ενώ δεκαέξι από τους 36 ερωτηθέντες (44%) στο αρχικό δοχείο μαγειρέματος με αλουμινόχαρτο ή πλαστικό κάλυμμα και κανείς δεν τα έκοψε σε μικρότερα κομμάτια (Anderson *et al.*, 2004).

Σε μια άλλη έρευνα σχετική με τις πρακτικές χειρισμού των τροφίμων στην Νέα Ζηλανδία από τον S. E. Gilbert (2007), η πλειοψηφία (234/320; 73.1%) απάντησε πως αφήνει να κρυώσουν τα περισσεύματα από μαγειρεμένο κρέας σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες το μέγιστο, πριν την συντήρηση του σε ψυγείο ή καταψύκτη. Όσον αφορά τις απαντήσεις για τον χρόνο συντήρησης του μαγειρεμένου κρέατος και πουλερικών στα ψυγεία, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 1.6. Όταν ρωτήθηκαν για την αναθέρμανση των περισσευμάτων, οι 261/312 (83,7%) δήλωσαν ότι αναθερμαίνουν το φαγητό μέχρι να αχνίσει, ενώ οι 34/312 (10,9%) δήλωσαν μέχρι απλά να ζεσταθεί. Οι υπόλοιποι ερωτηθέντες είτε δεν αναθέρμαιναν τα περισσεύματα (4,8%) ή δεν ήταν σίγουροι για την προτιμήσεις της αναθέρμανσης (0,6%). Οι περισσότεροι ερωτηθέντες 263/324 (81,8%) δήλωσαν ότι δεν στεγνώνουν τα χέρια τους με την ίδια πετσέτα που χρησιμοποιούν για να

στεγνώσουν τα σκεύη κουζίνας, και από αυτούς, οι 71/324 (21,9%) αφήνουν τα σκεύη να στεγνώσουν στο πλυντήριο πιάτων. Οι υπόλοιποι 61/324 (18,8%) δήλωσαν ότι θα χρησιμοποιούσαν την ίδια πετσέτα και για τις δύο διαδικασίες.

Πίνακας 1.6 : Χρονική διάρκεια όπου οι ερωτηθέντες συντηρούν το μαγειρεμένο κρέας ή πουλερικά στα οικιακά ψυγεία (Gilbert, 2007)

No. of days ^b	Cooked meats/poultry No. (%) of respondents, n=306
0-2	152 (49.7)
2.5-4	114 (37.3)
4.5-7	38 (12.4)
7-14	2 (0.7%)

Σε μια έρευνα στο Cape Peninsula University of Technology της Νότιας Αφρικής (Linda du Toit and Irma Venter, 2005) οι ερωτηθείσες ήταν 60 φοιτήτριες που κατοικούσαν σε εστίες. Η πλειοψηφία των ερωτηθέντων ανέφεραν πως αποθηκεύουν το τρόφιμο που είχαν προηγουμένως προετοιμάσει στο ψυγείο, αλλά επίσης αναφέρθηκε πως αφήνουν το φαγητό να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου, μετά το μαγείρεμα, πριν το τοποθετηθεί στο ψυγείο. Ομοίως, οι Jay *et al.* (1999a) ανάφεραν ότι το 85% των ερωτηθέντων στην τηλεφωνική έρευνα τους παραδέχτηκαν ότι άφηναν το μαγειρεμένο φαγητό να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου πριν την ψύξη του. Όσον αφορά την συντήρηση των περισσευμάτων, η πλειοψηφία των ερωτηθέντων ανέφεραν ότι τα τοποθετούσαν στο ψυγείο, σε σκεύος με καπάκι, για τρεις ημέρες ή και λιγότερο (Πίνακας 1.7).

Πίνακας 1.7: Απαντήσεις των ερωτηθέντων σχετικά με τον χειρισμό των μαγειρευμένων τροφίμων από την έρευνα των Linda du Toit και Irma Venter (2005)

Cooking food in advance and handling left-over food	Respondents	
Cooking food in advance of consumption		
Usually	24	40,0
Sometimes	8	13,3
Not cooking in advance	28	46,7
Storing food cooked in advance (n*=32)		
In refrigerator	26	81,3
In cupboard or on kitchen counter or stove	6	18,8
Leaving food to reach room temperature before refrigerating (n*=26)		
Usually	21	80,8
Sometimes	4	15,4
No	1	3,8
Handling left-over food		
Storing left-over food		
In refrigerator	49	81,7
In cupboard or on kitchen counter or stove	11	18,3
Storing left-over food in the refrigerator (n*=49)		
In container with lid	48	97,9
Not in container with lid	1	2,1
Storage time of left-over food in refrigerator (n*=49):		
3 days or less	44	89,7
4 days or more	5	10,3

Στην μελέτη των S. L. Godwin και R. J. Coppings(2005), οι περισσότεροι καταναλωτές είχαν κονσερβοποιημένα κρέατα και λουκάνικα, δύο έτοιμα προς κατανάλωση (RTE) τρόφιμα και αλλαντικά, στα ψυγεία τους (Πίνακας 1.8) και για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους (Πίνακας 1.9) σε σύγκριση με το άψητο κρέας. Οι καταναλωτές συνήθως συντηρούν τα έτοιμα προς κατανάλωση και παστά κρέατα στα ψυγεία τους από αρκετές ημέρες έως 2 εβδομάδες.

Πίνακας 1.8: Επιλογή τρόπου συντήρησης έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων και ωμού κρέατος από τους ερωτηθέντες(Godwin and Coppings, 2005).

Food Item	In Home? # (%)		Where in home? # (% of Yes)				
	Yes	No	Refrig.	Freezer	Cupboard	Counter	Other
Uncooked meat	469 (85)	82 (15)	83 (18)	441 (94)		3 (<1)	
Ground meat	411 (75)	140 (25)	48 (12)	387 (94)			1 (<1)
Luncheon meat	392 (71)	158 (29)	367 (94)	59 (15)	2 (<1)		1 (<1)
Cooked meat	300 (54)	250 (46)	259 (86)	60 (20)	1 (<1)		2 (<1)
Cured meat	306 (56)	244 (44)	215 (70)	119 (39)	2 (<1)		
Frankfurters	320 (58)	231 (42)	163 (51)	200 (63)			1 (<1)
Chicken	427 (78)	124 (22)	45 (11)	407 (95)	2 (<1)		3 (1)
Cooked veggies	251 (46)	299 (54)	221 (88)	21 (8)	16 (6)		1 (<1)

Πίνακας 1.9: Επιλογή χρονικής διάρκειας συντήρησης έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων και ωμού κρέατος από τους ερωτηθέντες(Godwin and Coppings, 2005).

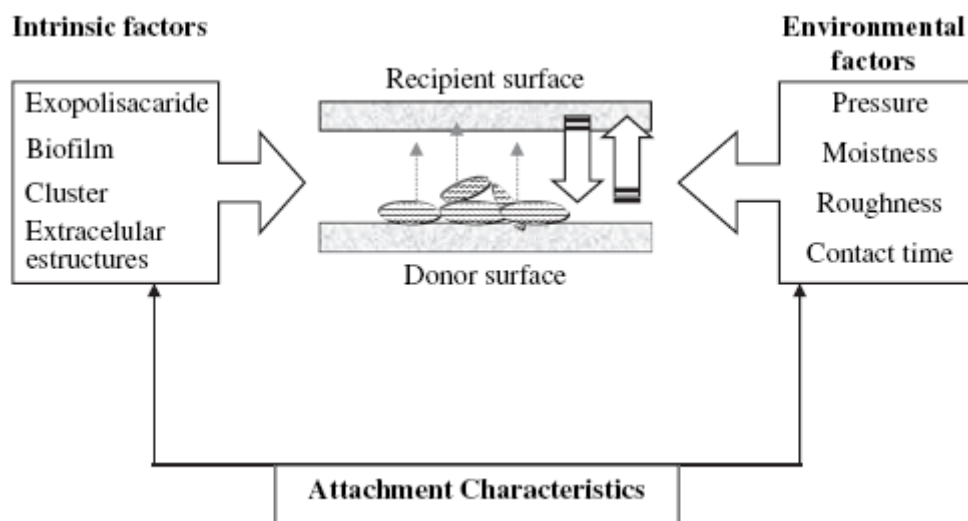
Food Item	1 day or less	2-3 days	4 days- week	1 to 2 weeks	3 weeks- 1 month	Over 1 month
Uncooked meat	42*	44	9	6	—	—
Ground meat	38	47	15	—	—	—
Chicken	36	38	18	2	—	1
Luncheon meat	8	24	43	20	4	1
Frankfurters	5	17	44	23	9	3
Cured meat	7	20	35	28	7	3
Cooked meat	30	47	19	3	<1	<1
Cooked vegetables	23	50	20	5	1	<1

1.4 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Τα δεδομένα σχετικά με την μεταφορά μπορούν να εκφραστούν από την έννοια του ρυθμού μεταφοράς (transfer rate, **TR**) (Chen *et al.*, 2001), που ορίζεται ως το ποσοστό των κυττάρων που μεταφέρονται από την επιφάνεια-τροφοδότη(donor surface) προς την επιφάνεια- αποδέκτη (recipient surface), το οποίο μπορεί να γραφτεί ως εξής:

$$TR = \frac{CFU \text{ recipient}}{CFU \text{ donor}} \times 100$$

Είναι γενικά γνωστό ότι η δυνατότητα μεταφοράς συνδέεται στενά με την βακτηριακή προσκόλληση (δηλαδή την δύναμη προσκόλλησης στην επιφάνεια). Παρ' όλα αυτά, οι παράγοντες που επηρεάζουν την βακτηριακή μεταφορά μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες: τους περιβαλλοντικούς και τους ενδογενείς παράγοντες (Εικόνα 1.7). Η πρώτη ομάδα αναφέρεται στις φυσικές και χημικές ιδιότητες του υλικού και του «μικροβιακού» στρώματος της επιφάνειας, στην υγρασία, στην πίεση, και στον χρόνο επαφής. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει παράγοντες που σχετίζονται με τα είδη των βακτηρίων, όπως την δυναμικότητα παραγωγής των εξωπολυσακχαριτών, τον σχηματισμό βιοϋμενίου, τον σχηματισμό αποικίας και την παρουσία εξω-κυτταρικών δομών (curli και fimbriae).



Εικόνα 1.7 : Βακτηριακή μεταφορά από την επαφή μεταξύ επιφανειών. Περιλαμβάνονται οι περιβαλλοντικοί και ενδογενείς παράγοντες που καθορίζουν την βακτηριακή μεταφορά (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2007)

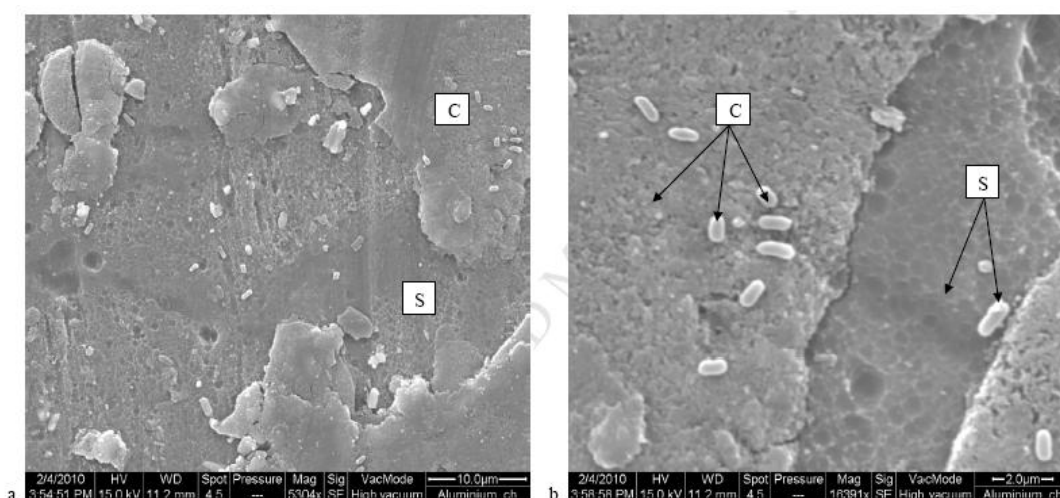
1.4.1 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οι μελέτες συνήθως συμφωνούν όσον αφορά τη σημασία του κλάσματος λίπος/χωρίς λίπος (άπαχο) και της περιεκτικότητα σε υγρασία στην βακτηριακή μεταφορά (Dickson, 1990; Kusumaningrum *et al.*, 2002; Luber *et al.*, 2006; Vorst *et al.*, 2006). Τα σχετικά στοιχεία με την περιεκτικότητα σε λίπος / χωρίς λίπος (άπαχο)

δείχνουν ότι η επαφή με μολυσμένα τρόφιμα με υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερο ρυθμό μεταφοράς σε σύγκριση με τις επιφάνειες χαμηλότερης περιεκτικότητας σε λιπαρά. Από γενική άποψη, αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα βακτήρια με υδροφοβικές ιδιότητες τείνουν να προσκολλούνται καλύτερα σε υδροφοβικά υλικά επιφανειών (PVC, καουτσούκ, λιπαρό κρέας, κλπ.) μειώνοντας έτσι τον αριθμό των βακτηρίων που είναι διαθέσιμα για μεταφορά (Chung, Dickson & Crouse 1989; Dickson & Koohmaraie 1989; Foong & Dickson. 2004; Sattar *et al.*, 2001). Ωστόσο, έχει επίσης αποδειχτεί ότι τα βακτήρια με υδρόφιλα χαρακτηριστικά προσκολλώνται καλύτερα σε υδρόφιλες επιφάνειες (π.χ. ανοξείδωτο χάλυβα, άπαχο τρόφιμο κλπ.). και ως εκ τούτου, σε αυτές τις περιπτώσεις, το εύρος της μεταφοράς θα είναι μικρότερο. Μια παραδειγματική περίπτωση αναφέρθηκε από τους Knobben, Van der Mei, Van Horn και Busscher (2007) στην μελέτη τους για το *S. aureus* (υδρόφιλο). Ανέφεραν ότι το *S. aureus* μεταφέρεται σε υδρόφιλες επιφάνειες πολύ εύκολα, αλλά στη συνέχεια, λόγω της δυνατής προσκόλλησης εμφάνισε μικρότερη μεταφορά σε άλλα υλικά. Από την άποψη αυτή, τα δεδομένα έδειξαν ότι οι υδρόφοβες / υδρόφιλες ιδιότητες τόσο της επιφάνειας αποδέκτη, όσο και της επιφάνειας τροφοδότη θα μπορούσαν να συμβάλουν σημαντικά στη μεταφορά βακτηρίων, αν και φαίνεται επιφάνειες-τροφοδότες ασκούν σαφέστερη και πιο σημαντική επίδραση (Knobben *et al.*, 2007; Vermeltfoort *et al.*, 2004). Επιπλέον, η παρουσία οργανικής ύλης ή συσσώρευσης μικροοργανισμών στις επιφάνειες θα μπορούσαν να τροποποιήσουν τα αρχικά φυσικό-χημικά χαρακτηριστικά των αδρανών επιφανειών (ανοξείδωτο χάλυβα, καουτσούκ, κ.λπ.) επηρεάζοντας την προσκόλληση και την μεταφορά των βακτηρίων (Absolom *et al.*, 1983). Στην πραγματικότητα, τα στοιχεία δείχνουν ότι οι επιφάνειες με διαφορετικές αρχικές ιδιότητες γίνονται παρόμοιες (υδρόφιλες) όταν καλύπτονται με τρόφιμα (Midelet & Carpentier, 2002).

Σε έρευνα των Abban, Jakobsen, & Jespersen (2012), η παρουσία τροφικών υπολειμμάτων στις αβιοτικές επιφάνειες προκάλεσε μείωση στα επίπεδα των προσκολλημένων κυττάρων σε όλες τις επιφάνειες και για τα δύο βακτήρια, *Escherichia coli* και *Salmonella Typhimurium*. Οι Bernbom *et al.* (2006) παρατήρησαν επίσης μείωση στα επίπεδα των προσκολλημένων κυττάρων για διάφορα βακτήρια όταν χρησιμοποίησαν εκχυλίσματα βοδινού και TSB σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα. Η παρουσία των τροφικών υπολειμμάτων αφαιρέθηκε και εξομαλύνθηκαν οι σημαντικές διαφορές που υπήρχαν προηγουμένως μεταξύ των

αβιοτικών υλικών της επιφάνειας, σε σχέση με τα επίπεδα των κυττάρων που προσκολλούνται. Έτσι, τα υπολείμματα γίνονται η νέα επιφάνεια για άμεση αλληλεπίδραση με τους μικροοργανισμούς, και σε αυτό το σημείο, δεν είναι διαφορετική για τις διάφορες αβιοτικές επιφάνειες. Σε αυτή την μελέτη δείχνουν αυτό το φαινόμενο πρώτη φορά για το αλουμίνιο και το πλαστικό. Αυτό το στρώμα των υπολειμμάτων μπορεί επίσης να ενεργεί ως προσκολλητικό, έτσι δένονται τα συγκρατημένα κύτταρα πιο έντονα με τις επιφάνειες και τα καθιστά δύσκολο να απομακρυνθούν. Τα βακτήρια έχουν προτίμηση να «κάθονται» σε περιοχές με υπολείμματα (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8 : Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης του *E. coli* K12 σε αλουμίνιο με παρουσία υπολειμμάτων κοτόπουλου σε a. x 5300 και b. x 16390 μεγέθυνση αντίστοιχα. Σημαντικά υψηλότερος αριθμός κυττάρων προσκολλούνται σε περιοχές της επιφάνειας με υπολείμματα (C: με τα βελάκια δείχνονται τα προσκολλημένα κύτταρα και οι κηλίδες κοτόπουλου) σε σύγκριση με τις γυμνές περιοχές της επιφάνειας (S: με τα βελάκια δείχνονται τα προσκολλημένα κύτταρα και η γυμνή μεταλλική επιφάνεια) (Abban *et al.*, 2012).

Από την άλλη πλευρά, είναι επίσης πιθανό ότι τα τρόφιμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά υποστηρίζουν καλύτερη μεταφορά μεταξύ επιφανειών σε σύγκριση με τα τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα, λόγω του υψηλότερου επιπέδου υγρασίας που συνδέεται στον άπαχο ιστό (Dickson, 1990). Έτσι, περισσότερη υγρασία θα μπορούσε να αποφέρει πιο χαλαρή προσκόλληση στον ιστό, και συνεπώς, μια μεγαλύτερη βακτηριακή μεταφορά. Ομοίως, έχει επίσης αποδειχθεί ότι η πρόσθετη υγρασία διευκολύνει τη μεταφορά από τον μολυσμένο ανοξείδωτο χάλυβα (Kusumaningrum *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003), τα υφάσματα (Marples & Towers,

1979; Sattar *et al.*, 2001) και τα χέρια (Merry *et al.*, 2001). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι τα βακτήρια μπορούν να μεταφερθούν μέσω των γαντιών (Heal *et al.*, 2003; Montville *et al.*, 2001) και ότι η υπάρχουσα υγρασία στα γάντια ενισχύει την βακτηριακή μεταφορά (Blom *et al.*, 2002; Gill & Jones, 2002; Mackintosh & Hoffman, 1984; Patrick, Findon, & Miller, 1997; Scott & Bloomfield, 1990).

Η τοπογραφία της επιφάνειας μπορεί να είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας για τη μεταφορά των βακτηρίων. Έτσι, οι μελέτες συχνά κάνουν διάκριση μεταξύ των λείων επιφανειών (π.χ. ανοξείδωτος χάλυβας) και των ανώμαλων επιφανειών (π.χ. καουτσούκ και PVC). Μερικές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η βακτηριακή προσκόλληση εξαρτάται από το βαθμό της τραχύτητας. Ωστόσο, άλλες δεν βρήκαν διαφορές στην μεταφορά των βακτηρίων στους διαφορετικούς βαθμούς τραχύτητας (Flint, Brooks, & Bremer, 2000). Η αιτία αυτής της διαφοράς θα μπορούσε να είναι οι διαφορές στις μεθόδους ανάκτησης που χρησιμοποιούνται μεταξύ των μελετών. Αντίθετα, μελέτες βακτηριακής μεταφοράς αποκάλυψαν ότι υπάρχει σαφής συσχέτιση μεταξύ της βακτηριακής τραχύτητας και της μεταφοράς (Dawson *et al.*, 2007; Knobben *et al.*, 2007; Midelet & Carpentier, 2002). Όσο μεγαλύτερη είναι η τραχύτητα, τόσο χαμηλότερη είναι η μεταφορά. Από την στιγμή που τα βακτήρια αποικίσουν στις τραχιές επιφάνειες, δεν είναι πλέον σε επαφή με την επιφάνεια μεταφοράς, και ως εκ τούτου, δεν μπορούν να μεταφερθούν. Τα αποτελέσματα αυτά αναφέρονται αποκλειστικά στις επιφάνειες-τροφοδότη. Επιπλέον, άλλα στοιχεία υποδεικνύουν ότι οι τραχιές επιφάνειες-αποδέκτης ενδέχεται να ευνοήσουν τη μεταφορά, όταν εφαρμόζεται τριβή (Knobben *et al.*, 2007). Όσον αφορά την απορροφητικότητα των επιφανειών, μπορεί να παρατηρηθεί ότι οι πορώδεις επιφάνειες (ρούχα, ποδιές, σφουγγάρια, κλπ.) παρουσιάζουν χαμηλότερα ποσοστά μεταφοράς σε σύγκριση με μη-πορώδεις επιφάνειες (ανοξείδωτος χάλυβας, πόμολα, κλπ.) (Kusumaningrum *et al.*, 2002; Rusin *et al.*, 2002; Scott & Bloomfield, 1990).

Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή, αν και η μεταφορά από τα υφάσματα φαίνεται ως χαμηλότερος κίνδυνος, θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η υγρασία που συσσωρεύεται στα πανιά και τα σφουγγάρια επιτρέπει στα βακτήρια να επιβιώσουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, και ως εκ τούτου, τα φαινόμενα βακτηριακής μεταφοράς μπορούν να γίνουν επίσης παρατεταμένα (Bloomfield, 2003). Εκτός από αυτό, η φθορά και τα γδαρσίματα (επακόλουθο της επανειλημμένης χρήσης και

καθαρισμού) είναι επιπλέον παράγοντες που επηρεάζουν την βακτηριακή μεταφορά, δεδομένου ότι σημαντική φθορά ή γρατσουνιές στις επιφάνειες διευκολύνουν τη συσσώρευση των μικροβιακών εναποθέσεων, όπου τα βακτήρια μπορούν να ενσωματωθούν ή να παγιδευτούν, με αποτέλεσμα να διατίθενται μικρότερος αριθμός βακτηρίων για μεταφορά. Ωστόσο, εξαιτίας αυτού του γεγονότος, τα βακτήρια προστατεύονται καλύτερα από το περιβαλλοντικό στρες που οδηγεί σε μια πιο παρατεταμένη διάρκεια μεταφοράς. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι οι διαδικασίες καθαρισμού και απολύμανσης γίνονται λιγότερο αποτελεσματικές όταν η επιφάνεια παρουσιάζει φθορά ή γρατσουνιές.

Όσον αφορά την επίδραση της πίεσης, η μελέτη από τους Vorst *et al.* (2004, 2006) έδειξε μια φαινομενικά θετική επίδραση αυτού του παράγοντα στην βακτηριακή μεταφορά, η οποία είναι επίσης σύμφωνη με τα πορίσματα των Kusumaningrum *et al.* (2002). Οι Moore και Griffith (2002) έδειξαν επίσης ότι η ανάκτηση από ανοξειδωτο χάλυβα αυξήθηκε με μηχανική ενέργεια. Στην ουσία, η υψηλή πίεση μειώνει τις αποστάσεις μεταξύ των επιφανειών, οδηγώντας σε πιθανές συνενώσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφάνειας και του μικροβιακού στρώματος (biofouling layer). Η πίεση μεταξύ των επιφανειών μπορεί μηχανικά να απελευθερώσει υπολείμματα που περιέχουν εγκλωβισμένα βακτήρια, έτσι ώστε να ωθείται η μεταφορά στην άλλη επιφάνεια. Όσον αφορά την επίδραση του χρόνου επαφής, είναι πολύ περιορισμένες οι πληροφορίες. Πρόσφατα, οι Dawson *et al.* (2007) βρήκαν ότι ο ρυθμός μεταφοράς αυξάνεται καθώς ο χρόνος επαφής αυξάνεται, αν και αυτό παρατηρήθηκε μόνο όταν το εμβόλιο στην επιφάνεια είχε επωαστεί για 8 ώρες ή περισσότερο. Ο Dickson (1990) πρότεινε ότι όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια επαφής, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των συνενώσεων και των αλληλεπιδράσεων που μπορεί να εμφανιστούν στην επιφάνεια-παραλήπτης (δηλαδή όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επαφής, τόσο υψηλότερος είναι ο ρυθμός μεταφοράς). Πράγματι, σύμφωνα με μελέτες σχετικές με την προσκόλληση, η βακτηριακή προσκόλληση αυξάνει την πάροδο του χρόνου (Guðbjörnsdóttir *et al.*, 2005).

1.4.2 Ενδογενείς παράγοντες

Η επίδραση του μεγέθους του εμβολίου μελετήθηκε από τους Montville και Schaffner (2003), όπου η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι το μέγεθος του εμβολίου είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην αποτελεσματικότητα της μεταφοράς. Παρατήρησαν μια έντονη αρνητική γραμμική τάση μεταξύ του αρχικού εμβολίου και του ρυθμού μεταφοράς για σχεδόν όλα τα δεδομένα. Όταν ο πληθυσμός των βακτηρίων στην επιφάνεια-τροφοδότης ήταν υψηλός, το ποσοστό μεταφοράς ήταν σχετικά χαμηλό. Όταν ο πληθυσμός στην επιφάνεια-τροφοδότης ήταν χαμηλότερος, το ποσοστό μεταφοράς έτεινε να είναι υψηλότερο. Η επιρροή του μεγέθους του εμβολίου στη δύναμη προσκόλλησης αποδεικνύεται από άλλους συγγραφείς που την προτείνουν ως μια πιθανή εξήγηση. Ένας άλλος παράγοντας που θα μπορούσε να εξηγήσει αυτό το φαινόμενο είναι το μέγεθος του μικροβιακού συσσωματώματος. Οι Sommer, Martin-Rouas και Mettler (1999) το απέδειξαν για το *Pseudomonas* spp. Σε βιοϋμένια με υψηλούς προσκολλημένους πληθυσμούς, οι μικροαποικίες ήταν μικρές, αλλά σπάνιες και πλατιές για χαμηλούς προσκολλημένους πληθυσμούς. Αυτό το γεγονός θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί το χαμηλό αρχικό εμβόλιο θα μπορούσε να αποφέρει μεγαλύτερο ποσοστό: η μεταφορά από την επαφή μεταξύ επιφανειών με τον ίδιο αριθμό μικροαποικιών, μεγαλύτερη για τα χαμηλά επίπεδα ενοφθαλμίσματος και μικρότερη για τα υψηλά επίπεδα ενοφθαλμίσματος, θα οδηγήσει σε υψηλότερο ρυθμό μεταφοράς για την πρώτη περίπτωση αφού ο συνολικός αριθμός των μεμονωμένων κύτταρων που θα μεταφερθούν θα είναι μεγαλύτερος.

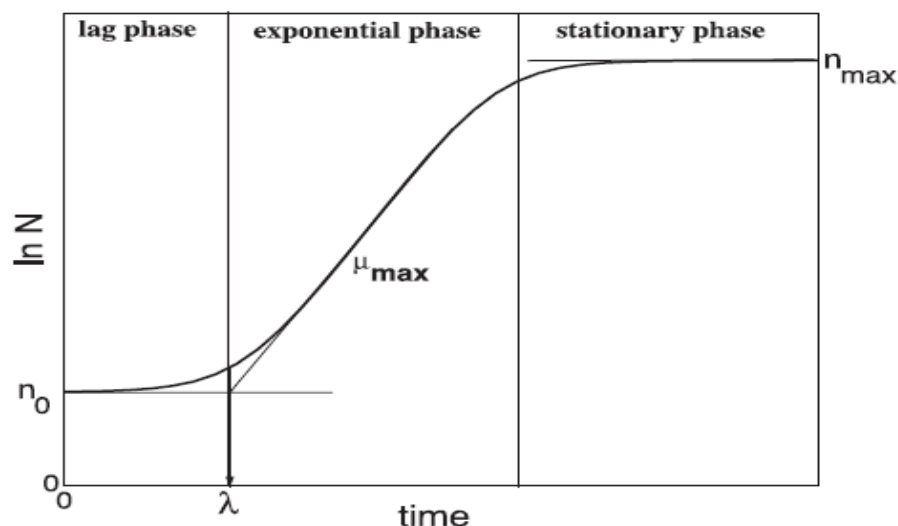
Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η ικανότητα μεταφοράς εξαρτάται από τα είδη των βακτηρίων (Knobben *et al.*, 2007; Midelet & Carpentier, 2002; Midelet, Kobilinsky, & Carpentier, 2006), το οποίο πιθανώς σχετίζεται με τη διαφορά στα χαρακτηριστικά προσκόλλησης μεταξύ των ειδών. Εκτός από αυτό, άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με είδη βακτηρίων έχουν αποδειχθεί σημαντικοί στην μεταφορά (π.χ. συνθήκες πριν την καλλιέργεια, χειρισμοί απολύμανσης, μικτές καλλιέργειες, κλπ.). Ωστόσο, τα ευρήματα των Kusumaningrum *et al.* (2002) έδειξαν ότι σε ορισμένες περιπτώσεις τα διαφορετικά είδη μπορεί να μην είναι σημαντικά για την βακτηριακή μεταφορά. Προκειμένου να εξηγηθεί η διαφορά στα αποτελέσματα τους, μπορεί να υποτεθεί ότι ο συνδυασμός υψηλής υγρασίας και πίεσης (500 γραμμάρια) που

εφάρμοσαν, θα μπορούσε να διευκολύνει την βακτηριακή προσκόλληση, μειώνοντας έτσι τη διαφορά μεταξύ των ειδών και εξισώνοντάς την ικανότητα μεταφοράς. Σε παρόμοιο πείραμα από τους Midelet και Carpentier (2002) και Midelet *et al.* (2006), τα δεδομένα έδειξαν ότι η επίδραση των ειδών θα μπορούσε να είναι αμελητέα, λόγω της πιο σημαντικής επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων (πίεση, υγρασία, κ.λπ.) για τη μεταφορά των βακτηρίων. Επιπλέον, οι Vermeltfoort *et al.* (2004) διαπίστωσαν ότι τα είδη δεν επηρεάζουν τη μεταφορά ως μοναδικός παράγοντας, αλλά όταν συνδυάστηκε με τον χρόνο επαφής. Εν κατακλείδι, όταν αυξάνεται ο χρόνος επαφής, ενισχύει τις πιθανές διαφορές μεταξύ των ειδών που πιθανόν να οφείλεται στις διαφορές των διαδικασιών προσκόλλησης, όπως την παραγωγή ικανότητα των εξωπολυσακχαριτών ή την παρουσία επιπλέον κυτταρικών δομών, κλπ. Στη συνέχεια, τα υψηλά επίπεδα υγρασίας και πίεσης μειώνουν τις διαφορές μεταξύ των ειδών. Στην πρώτη περίπτωση, αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η προσκόλληση αποδυναμώνεται από την υγρασία και στη δεύτερη περίπτωση, επειδή τα βακτήρια που έχουν ενσωματωθεί στην οργανική ύλη αφαιρούνται εύκολα με την υψηλή πίεση και την τριβή.

1.5 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Στην κινητική των βακτηρίων ανήκουν 4 φάσεις, οι οποίες είναι: η λανθάνουσα φάση, η εκθετική φάση, η φάση στασιμότητας και η φάση κάμψης ή θανάτου (Εικόνα 1.9). Η λανθάνουσα φάση (lag phase) παρατηρείται συνήθως ως καθυστερημένη ανταπόκριση του μικροβιακού πληθυσμού σε (ξαφνική) αλλαγή του περιβάλλοντος. Στην διάρκεια της εκθετικής φάσης τα κύτταρα αναπτύσσονται όσο πιο γρήγορα είναι δυνατό σ' αυτό το περιβάλλον. Κατά την φάση αυτή τα κύτταρα επιδεικνύουν εξισορροπημένη ανάπτυξη, κατά την οποία ο ρυθμός σύνθεσης κάθε συστατικού του κυττάρου (ένζυμα, δομικά μόρια, DNA, κ.ά.) είναι τέτοιος ώστε να μην γίνεται μεγαλύτερη σύνθεση απ' αυτή που απαιτείται για την παραγωγή νέων κυττάρων, δηλαδή ολόκληρη η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων κατευθύνεται στην αναπαραγωγή. Καθώς ο πληθυσμός συνεχίζει να αυξάνεται, η συσσώρευση των μεταβολιτών μέσα στο περιβάλλον γίνεται αρκετά απαγορευτική

(παρεμποδιστική), ώστε να προκαλεί μείωση στο ρυθμό αύξησης του αριθμού των κυττάρων. Κατά την διάρκεια αυτής της φάσης, οι συνθήκες μπορεί να γίνουν τόσο απαγορευτικές ώστε να οδηγήσουν στο θάνατο και την λύση των κυττάρων, οπότε ο καθαρός ρυθμός αύξησης του πληθυσμού μειώνεται συνεχώς μέχρι την τιμή μηδέν (φάση στασιμότητας).



Εικόνα 1.9 : Τυπική καμπύλη ανάπτυξης βακτηρίων σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας. Στο σχεδιάγραμμα διακρίνουμε, n_0 : αρχικός πληθυσμός, n_{max} : μέγιστος πληθυσμός βακτηρίων, μ_{max} : μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και ο χρόνος λανθάνουσας φάσης λ .

Σε περίπτωση συνθηκών ανάπτυξης, η λανθάνουσα φάση είναι μια περίοδος προσαρμογής κατά την οποία τα βακτηριακά κύτταρα τροποποιούνται μόνα τους, προκειμένου να επωφεληθούν από το νέο περιβάλλον και να ξεκινήσουν την εκθετική αύξηση (Buchanan και Klawitter, 1991). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διάρκεια του χρόνου καθυστέρησης είναι οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η ταυτότητα και ο φαινότυπος του βακτηρίου (Buchanan και Cygnarowicz, 1990), το στάδιο ανάπτυξης ή το ιστορικό της φυσιολογίας των κυττάρων (McMeekin *et al.*, 1993) και σε περίπτωση μικρού μεγέθους εμβολίου και δύσκολων συνθηκών, το μέγεθος του εμβολίου κατά τη στιγμή της αλλαγής του περιβάλλοντος (π.χ., Augustin *et al.*, 2000a).

Περιβαλλοντικές συνθήκες

Είναι γνωστό ότι η λανθάνουσα φάση εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Έχει παρατηρηθεί από τους Buchanan και Klawitter (1992), για παράδειγμα, ότι η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης για το *Escherichia coli* O157: H7 αυξάνει με την μείωση της θερμοκρασίας επώασης. Οι Zwietering *et al.* (1994) αξιολόγησαν την επίδραση των αλλαγών της θερμοκρασία για το *Lactobacillus plantarum*. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αλλαγή της θερμοκρασίας (κατά την φάση καθυστέρησης καθώς και την εκθετική φάση) έχει ως αποτέλεσμα μια πρόσθετη φάση καθυστέρησης. Οι Bernaerts *et al.* (2002) έχει παρατηρήσει ότι οι μεγάλες αλλαγές της θερμοκρασίας διαταράσσουν την εκθετική αύξηση του *E. coli* K12. Μια μεγάλη αλλαγή θερμοκρασίας από το 17,5 στο 32,5° C οδήγησε σε μια ενδιάμεση λανθάνουσα φάση, ενώ μια μικρή αλλαγή θερμοκρασίας από το 22,5 στο 27,5° C έφερε άμεση προσαρμογή στις νέες συνθήκες. Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν από πολλούς άλλους συγγραφείς, οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση των μεταβολών της θερμοκρασίας και τις διακυμάνσεις στην φάση καθυστέρησης (Fu *et al.*, 1991; Casadei *et al.*, 1995; Rajkowski and Marmer, 1995; Membre *et al.*, 1999) . Εκτός από τη θερμοκρασία, επιπλέον περιβαλλοντικές συνθήκες επίσης επηρεάζουν τη διάρκεια της φάσης καθυστέρησης. Οι Cheroutre-Vialette και Lebert (2002) παρατήρησαν μια λανθάνουσα φάση για το *L. monocytogenes*, όταν υποβλήθηκε σε απότομη μεταβολή του pH και της δραστηριότητας νερού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του, σε οποιαδήποτε θερμοκρασία ανάπτυξης. Οι Mellfont *et al.* (2004) βρήκαν ότι όταν Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως τα *S. typhimurium* και *E. coli* μεταφέρθηκαν από υψηλή (0.993) σε χαμηλή (0.947) a_w περιβάλλοντος, ο χρόνος καθυστέρησης αυξήθηκε. Μελέτες σε Gram θετικά βακτήρια, όπως το *L. monocytogenes*, επικεντρώθηκαν στις συνθήκες πριν την καλλιέργεια τους, όπως το pH (Francois *et al.*, 2007) ή άλλων μεμονωμένων καταπονήσεων, όπως χρήση χλώριου, έλλειψη θρεπτικών, σχηματισμός βιοϋμενίου, ή χρήση NaCl (Guillier *et al.*, 2005; Jacobsen and Koch, 2006) σχετικά με τη χρονική υστέρηση της *L. monocytogenes*. Σε γενικές γραμμές, οι μικρότερες περιβαλλοντικές αλλαγές θα αποφέρουν μικρότερα στάδια προσαρμογής.

Οι Stephens *et al.* (1997) μέτρησαν τον χρόνο προσαρμογής και την μεταβλητότητα του παθογόνου *Salmonella* με τη χρήση Bioscreen, και έδειξε ότι τα κύτταρα που είχαν τραυματιστεί από θερμότητα παρουσίασαν μεγαλύτερους και πιο

μεταβλητούς χρόνους προσαρμογής. Χρησιμοποιώντας το Bioscreen με *L. monocytogenes*, οι Robinson *et al.* (2001) έδειξαν, ότι οι χρόνοι ανίχνευσης (και ως εκ τούτου οι χρόνοι προσαρμογής) αυξήθηκαν και έγινε πιο μεταβλητοί όταν τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες NaCl στο θρεπτικό μέσο. Οι McKellar *et al.* (2002β) δουλεύοντας με Bioscreen σε *L. monocytogenes* διαπίστωσαν ότι η μείωση του pH του θρεπτικού μέσου κοντά στο όριο ανάπτυξης οδήγησε σε αύξηση του χρόνου προσαρμογής και του standard deviation . Ομοίως, οι Francois *et al.* (2005) έδειξαν επίσης, με *L. monocytogenes* που καλλιεργήθηκε σε Bioscreen, ότι οι χρόνοι προσαρμογής και η μεταβλητότητα τους αυξήθηκαν όταν η θερμοκρασία και το pH μειώθηκαν κοντά στο όριο ανάπτυξης.

Στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων

Οι Whiting και Bagi (2002) εξέτασαν τις διάρκειες της φάση καθυστέρησης για τα κύτταρα του *L. monocytogenes* που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές καταστάσεις φυσιολογίας και μεταφέρθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες: τα εκθετικά αναπτυσσόμενα κύτταρα είχαν τις μικρότερες φάσεις καθυστέρησης, τα κύτταρα που βρίσκονταν σε στατική φάση και αυτά που είχαν έλλειψη θρεπτικών στοιχείων είχαν μεγαλύτερη διάρκεια καθυστέρησης, τα παγωμένα κύτταρα είχαν ελάχιστα μεγαλύτερη διάρκεια καθυστέρησης και τα αφυδατωμένα κύτταρα παρουσίασαν τις μεγαλύτερες λανθάνουσες φάσεις. Αντίστοιχα, οι Augustin *et al.* (2000b) και οι Mellefont *et al.* (2000) είχαν καταλήξει για τα *L. monocytogenes* και *E. coli* ότι τα κύτταρα που είχαν κανονική ανάπτυξη προσαρμόστηκαν πιο γρήγορα στις αλλαγές σε σύγκριση με τα κύτταρα που ήταν στην φάση καθυστέρησης ή την φάση στασιμότητας.

Μέγεθος εμβολίου

Η επίδραση του μεγέθους του εμβολίου στη λανθάνουσα φάση έχει μελετηθεί από τους Augustin *et al.* (2000a), οι οποίοι χρησιμοποίησαν *L. monocytogenes* που καλλιεργήθηκε σε φτωχό θρεπτικό μέσο σε συνθήκες διαφορετικές από τις βέλτιστες. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο χρόνος καθυστέρησης παρατείνεται όταν το εμβόλιο είναι αρκετά στρεσαρισμένο από την έλλειψη θρεπτικών και το μέγεθος του είναι πολύ μικρό. Αυτή η επίδραση του μεγέθους του εμβολίου μπορεί να εξηγηθεί

από την αύξηση στην ποικιλία στους χρόνους καθυστέρησης των κυττάρων, όταν τα κύτταρα έχουν υποστεί βλάβες από καταπόνηση. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν από τους Robinson *et al.* (2001), Pascual *et al.* (2001) και McKellar *et al.* (2002α) που επίσης έδειξαν για το *L. monocytogenes* ότι η επίδραση του μεγέθους του εμβολίου είναι πιο έντονη κοντά στο οριακό σημείο ανάπτυξης / όχι ανάπτυξης, διότι δεν προσαρμόζονται όλα τα κύτταρα στις δυσμενείς συνθήκες. Πολλοί συγγραφείς μελέτησαν την επίδραση παραγόντων καταπόνησης όπως, του pH, της θερμοκρασίας, κ.λπ., σχετικά με την κατανομή των χρόνων καθυστέρησης των κυττάρων (Métris *et al.*, 2002; Smelt *et al.*, 2002; Francois *et al.*, 2003b). Παρατήρησαν ότι όταν οι στρεσογόνοι παράγοντες αυξάνονται, ο μέσος χρόνος καθυστέρησης είναι υψηλότερος και η διανομή γίνεται ευρύτερη (αυξανόμενη μεταβλητότητα).

Σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες, ο ρυθμός ανάπτυξης θεωρείται ανεξάρτητος από το αρχικό μέγεθος εμβολίου (Robinson *et al.*, 2001). Ως εκ τούτου, η προαναφερθείσα διαφορά στην συνολική λογαριθμική αύξηση διαφορετικών εμβολίων πρέπει να οφείλεται μόνο στην μεταβλητότητα των επιμέρους χρόνων προσαρμογής. Τονίζεται όμως σε έρευνα των Manios *et al.*, (2011), ότι η πλειοψηφία των ερευνών σχετικά με την επίδραση του μεγέθους εμβολίου στην κινητική ανάπτυξη των παθογόνων έχει εκτελεστεί σε υγρό μέσο, όπου μετά από κάθε διαίρεση των βακτηρίων, τα θυγατρικά κύτταρα απομακρύνονται από το μητρικό κύτταρο. Έτσι, η πιθανότητα της «επίδρασης συνωστισμού» (growth effect), δηλαδή η επιβράδυνση της ανάπτυξης λόγω αλληλεπιδράσεων των κυττάρων που βρίσκονται κοντά, είναι περιορισμένη και αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί ο ρυθμός ανάπτυξης των πλαγκτονικών αποικιών δεν επηρεάζεται από το αρχικό μέγεθος εμβολίου. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα είναι ακινητοποιημένα σε στερεό υλικό, όπως στην περίπτωση των φρεσκοκομμένων σαλατών, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε αποικίες και ως εκ τούτου, οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να προκύψουν μεταξύ των κυττάρων στην ίδια την αποικία (ειδικά μεταξύ των κυττάρων στο εσωτερικό και στο εξωτερικό μέρος των αποικιών) ή μεταξύ γειτονικών αποικιών. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι πιθανόν να αυξάνονται με την απόσταση των αποικιών, δηλαδή με την πυκνότητα του πληθυσμού, επειδή όσο υψηλότερος ο πληθυσμός τόσο χαμηλότερη η απόσταση μεταξύ των αποικιών. Αυτό πιθανότατα εξηγεί τον πιο αργό ρυθμό ανάπτυξης των 1000 κυττάρων / δείγμα σε σχέση με εκείνη των λίγων κυττάρων / δείγμα.

Οι χρόνοι καθυστέρησης και οι ρυθμοί ανάπτυξης των κυριότερων τροφιογενών παθογόνων και ορισμένων μικροοργανισμών αλλοίωσης έχουν μετρηθεί σύμφωνα με ένα ευρύ φάσμα συνθηκών ανάπτυξης για να αναπτυχθούν μέθοδοι για την πρόβλεψη της μικροβιακής συμπεριφοράς στα τρόφιμα. Τα δεδομένα έχουν ενσωματωθεί σε μαθηματικά μοντέλα που επιτρέπουν την πρόβλεψη των ρυθμών ανάπτυξης σε πολλά βακτήρια με αρκετή ακρίβεια από τη γνώση της θερμοκρασίας, του pH, του περιεχόμενου σε διαλυμένες ουσίες ή της δραστηριότητα του νερού, της ύπαρξης αερίων και συντηρητικών (McMeekin *et al.*, 1993).

Σε έρευνα των Tiganitas *et al.*, (2009) αξιολογήθηκαν οι αποκρίσεις της ανάπτυξης του *L. monocytogenes* για διαφορετικές καταστάσεις φυσιολογίας του εμβολίου (δηλαδή, αύξηση προηγουμένως σε υψηλή ή χαμηλή a_w και pH 5-7 στους 30 ° C), σε οσμωτική καταπόνηση, που επιτρέπει ανάπτυξη, εύρους 0,940 - 0,995 (ουδέτερο pH) στους 10 ° C. Ο ρυθμός ανάπτυξης αυξήθηκε και η λανθάνουσα φάση μειώθηκε με την αύξηση της δραστηριότητα του νερού για όλες τις περιπτώσεις του εμβολίου. Ο μέγιστος ειδικός ρυθμό ανάπτυξης της *L. monocytogenes* μειώθηκε γραμμικά με την αύξηση της ωσμωτικότητας. Οι παραπάνω μεταβολές στην κινητική με την ωσμωτική πίεση που δημιουργήθηκε από το NaCl είναι σύμφωνες με προηγούμενες έρευνες (Robinson *et al.*, 1998), γεγονός που υποδηλώνει ότι πάνω από μια κρίσιμη συγκέντρωση, το NaCl επηρεάζει τον χρόνο προσαρμογής περισσότερο από το ρυθμό ανάπτυξης. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση των ενεργειών που απαιτούνται για την προσαρμογή στις οσμωτικά δυσμενείς συνθήκες (Robinson *et al.*, 1998; Mellfont *et al.*, 2003). Από αυτή την άποψη, οι διαφορετικές φυσιολογικές καταστάσεις του ενοφθαλμίσματος δεν επηρέασαν σημαντικά τους ρυθμούς ανάπτυξης σε υψηλή ωσμωτικότητα αλλά επηρέασε τον χρόνο προσαρμογής και ως εκ τούτου, την παράμετρος h_0 του μοντέλου Baranyi. Η παράμετρος h_0 αντιπροσωπεύει το έργο που πρέπει παραχθεί από τον οργανισμό για να προσαρμοστεί στο νέο περιβάλλον και είναι ανάλογη με τη σχετικό χρόνο προσαρμογής (Mellfont *et al.*, 2003). Σε γενικές γραμμές, η h_0 έχει την τάση να αυξάνεται ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε υψηλά επίπεδα NaCl, καθώς και σε συνδυασμό με τη μετάβαση από χαμηλό pH πριν την καλλιέργεια σε ουδέτερο pH για ανάπτυξη. Ο ρυθμός ανάπτυξης των εμβολίων που είχαν προηγουμένως προσαρμοστεί σε pH 6,0 ήταν υψηλότερος σε a_w 0,95 σε σύγκριση με τις

καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί σε pH 7,2. Από αυτό προκύπτει ότι η αρχική προσαρμογή σε χαμηλό pH μπορεί επίσης να επιφέρει ενισχυμένη προσαρμογή στην οσμωτική καταπόνηση των κυττάρων, έτσι ώστε να μπορούν να ξεκινήσουν ταχύτερα την ανάπτυξη σε χαμηλότερες δραστηριότητες νερού σε σύγκριση με τα κύτταρα που προηγουμένως καλλιεργήθηκαν σε ουδέτερο pH (Skandamis *et al.*, 2007). Οι Cheroutre-Vialette *et al.*, (1998) έδειξαν σε έρευνα τους, που υπέβαλλαν το βακτήριο *Listeria monocytogenes*, ότι οι καταπονήσεις από χαμηλό pH και NaCl έφεραν μικρότερο χρόνο προσαρμογής αλλά και μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης όταν εφαρμόστηκαν κατά την εκθετική φάση σε σύγκριση με την ανάπτυξη του εξαρχής σε περιοριστικό διάλυμα με τις ίδιες συνθήκες καταπόνησης. Επίσης, σε σύγκριση και με τους δυο μεθόδους όπου οι μικροοργανισμοί υποβλήθηκαν σε καταπόνηση, όταν αναπτύχθηκαν σε κανονικό θρεπτικό διάλυμα χωρίς καταπόνηση ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν πιο μεγάλος και ο χρόνος προσαρμογής μικρότερος.

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης των Lianou και Koutsoumanis *et al.*, (2011), και οι δυο περιβαλλοντικοί παράμετροι που έθεσαν, το pH και το NaCl, φάνηκε να επηρεάζουν τη μεταβλητότητα στους παραμέτρους της κινητικής ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη του *Salmonella enterica*, δείχνοντας έτσι ότι ο ρυθμός ανάπτυξης επηρεάζεται άμεσα και έντονα από το στέλεχος του μικροοργανισμού που υποβάλλεται σε καταπόνηση. Επιπλέον, όπως προκύπτει από τις τιμές του συντελεστή μεταβλητότητας (CV), η μεταβλητότητα των μ_{max} μεταξύ των στελεχών του *S. enterica* ήταν μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρήθηκε σε κάθε στέλεχος ξεχωριστά σε όλες τις τιμές pH και επίπεδα NaCl που ελέγχθηκαν. Επίσης αποδείχτηκε ότι η μεταβλητότητα των στελεχών των υπολογισμένων τιμών μ_{max} αυξάνεται όταν οι συνθήκες ανάπτυξης γίνονται πιο στρεσογόνες.

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι οικιακοί σπόγγοι έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να αποτελέσουν πιθανό μέσο μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών σε περιέκτες συντήρησης τροφίμων και από εκεί να μεταφερθούν σε Έτοιμα Προς Κατανάλωση (Ready-to-Eat) ή προμαγειρεμένα τρόφιμα. Κατά την πορεία αυτή, οι μικροοργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με πληθώρα στρεσογόνων συνθηκών, όπως π.χ. παρουσία

απορρυπαντικού, αφυδάτωση λόγω εξάτμισης νερού, οξέα από τα υπολείμματα τροφών κτλ., οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την επιβίωση/ανάκτηση ή τις παραμέτρους κινητικής του παθογόνου. Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της παραμονής του παθογόνου *Salmonella* sp. στην επιφάνεια σκευών συντήρησης τροφίμων, διαφορετικού υλικού, παρουσία διαφορετικών υπολειμμάτων τροφών (α) στην μεταφορά του παθογόνου σε προ-μαγειρεμένα γεύματα, και (β) στις παραμέτρους κινητικής του μικροοργανισμού, όταν αυτός εκτεθεί σε συνθήκες ήπιας οξύτητας και αλατότητας.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αναλώσιμα υλικά

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας και τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε μια πληθώρα υλικών, ανόργανων και οργανικών χημικών αντιδραστηρίων αλλά και τυποποιημένα σκευάσματα θρεπτικών υποστρωμάτων.

2.1.1 Θρεπτικά υποστρώματα

Ως θρεπτικό υλικό σε όλη την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το στερεό σε μορφή σκόνης υπόστρωμα Tryptic Soy Broth (TSB) (Biolife, 4012302, Milano, Italia) του οποίου το pH σε υδατικό διάλυμα ρυθμίζονταν, όταν χρειαζόταν, με γαλακτικό οξύ (lactic acid).

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα:

- Tryptic Soy Agar (TSA) και
- Xylose Lysine Desoxycholate (XLD)

Το Tryptic Soy Agar, TSA χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια μιας ευρείας ποικιλίας αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών.

Το XLD Agar (Άγαρ Ξυλόξης Λυσίνης Δεσοξυχολικού άλατος) είναι ένα μετρίως εκλεκτικό και διαφορικό υλικό για την απομόνωση και διαφοροποίηση αρνητικών κατά Gram εντερικών παθογόνων (*Salmonella* και *Shigella*). Περιέχει εκχύλισμα ζυμομυκήτων ως πηγή θρεπτικών συστατικών και βιταμινών. Η ξυλόζη, η λακτόζη και η σακχαρόζη, παρέχουν πηγές ικανών για ζύμωση υδατανθράκων. Η ξυλόζη ενσωματώνεται στο υλικό γιατί ζυμώνεται από όλους σχεδόν τους εντερικούς οργανισμούς εκτός από τα είδη του γένους *Shigella* και η ιδιότητά της αυτή επιτρέπει τη διαφοροποίησή τους. Αφού εξαντλήσουν τα είδη *Salmonella* την προμήθεια ξυλόξης, στη συνέχεια χρησιμοποιούν τη λυσίνη μέσω του ενζύμου αποκαρβοξυλάση της λυσίνης, με αναστροφή σε αλκαλικό pH. Με τη λυσίνη επιτρέπεται η διαφοροποίηση των ειδών του γένους *Salmonella*, γιατί χωρίς τη λυσίνη τα είδη του

γένους *Salmonella* θα ζύμωναν ταχέως την ξυλόζη και δεν θα διακρίνονταν από τα μη παθογόνα είδη.

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

2.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Η εργαστηριακή υποδομή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας περιελάμβανε τα σκεύη, όργανα και συσκευές που αναφέρονται παρακάτω:

A) Σκεύη:

1. γυάλινες φιάλες duran
2. δοκιμαστικοί σωλήνες
3. κωνικές φιάλες
4. γυάλινες πιπέττες μετρήσεως
5. γυάλινα σφαιρίδια (beads)
6. λύχνος υγραερίου εργαστηριακός
7. μαγνήτες αναδέυσεως (διαφόρων μεγεθών)
8. μικροβιολογικός κρίκος
9. ογκομετρικοί κύλινδροι
10. μικροβιολογικό τρίγωνο
11. πλαστικοί περιέκτες falcon (χωρητικότητας 15 ml)
12. τρυβλία Petri (Sarstedt)

13. πλαστικά Honeycomb 2 Microplates 100 οπών για το Bioscreen
14. ποτήρια ζέσεως
15. ρύγχη (tips) των 100 µl (=0,1 ml), 1000 µl (=1 ml) και 10 ml για τις πιπέττες μεταβλητού όγκου
16. στατό δοκιμαστικών σωλήνων
17. υδροβολέας
18. γάζες και αποστειρωμένοι βαμβακοφόροι στυλεοί (cotton swabs)
19. αντικειμενοφόρες πλάκες
20. μεταλλικά κουπόνια
21. γυάλινα χωνιά

Πίνακας 2.1 : Χρησιμοποιούμενα εργαστηριακά όργανα και συσκευές

Όργανο-συσκευή	Μοντέλο	Εταιρεία
1 Αναλυτικοί ζυγοί	Mark (0,01g)	BEL ENGINEERING
	BP 3105 (0,001g)	Sartorius
2 Επωαστικοί θάλαμοι	BE 500	Memmert
3 Κλίβανος αποστείρωσης	OT 4060	nüve
4 Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής	NU-425-400E	NuAire
5 Μετρητής αποικιών	C5	Stuart Scientific
6 Πεχάμετρο	pH 526	WTW
7 Πιπέττες μεταβλητού όγκου	Pipetman	Gilson
	Labopette 20-200 µl	Hirschmann Laborgerate
8 Πολύ-κάναλη πιπέττα μεταβλητού όγκου	Multimate +	High Tech Lab
9 Συσκευή ανάμιξης	K-550-GE	Vortex-GENIE
10 Συσκευή Microbiology Reader Bioscreen	Bioscreen C MBR System	Growth Curves
11 Συσκευή ανάδευσης με θέρμανση	ARE VELP	Scientifica
12 Συσκευή ομογενοποίησης	Stomacher 400	Seward
13 Blender	BLENDER HGB5051	WARING
14 Φούρνος μικροκυμάτων	Easy Grill,	Whirlpool
15 Υδατόλουτρο	WB 14	Memmert
16 Φυγόκεντροι	Megafuge 1.0 R	Heraeus instruments
17 Συσκευή αεροστεγούς θερμοσυγκόλλησης	VC 999	Inauen Maschinen

2.3 Μικροβιακά στελέχη

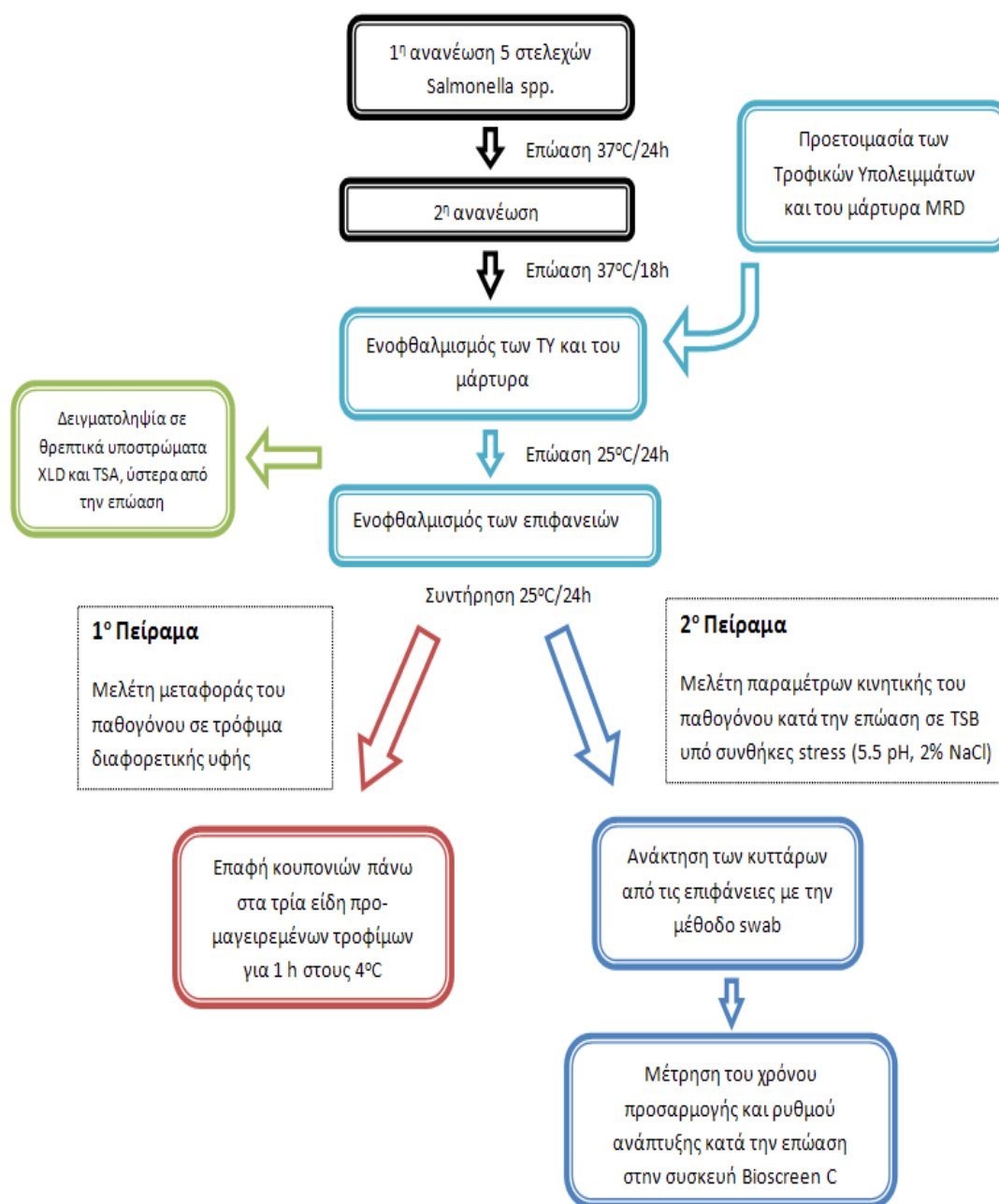
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συμπεριφορά πέντε στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. υπό συγκεκριμένες συνθήκες εμποδίων και καταπόνησης. Τα μελετηθέντα στελέχη *Salmonella enterica* προέρχονται από συλλογή απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών που διατηρεί το Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων (Πίνακας 2.2). Οι μικροοργανισμοί συντηρούνται στους -20°C σε Nutrient broth, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 50% του συνολικού όγκου.

Πίνακας 2.2: Τα 5 στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. που μελετήθηκαν.

Κωδικός	Στέλεχος	Εργαστηριακός αριθμός	Προέλευση
PS1	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar <i>enterica</i> (ex <i>Kauffman and Edwards</i>) <i>Le Minor and Poppof</i> serovar <i>Typhimurium</i>	4/74	Έντερα μοσχαριού
PS2	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar <i>enterica</i> (ex <i>Kauffman and Edwards</i>) <i>Le Minor and Poppof</i> serovar <i>Typhimurium</i>	DT 193	Άνθρωπος
PS3	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar <i>Agona</i>	23	Ζωοτροφές
PS5	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar <i>Reading</i>	655	Ζωοτροφές
PS12	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritis PT4 P167807</i>	PT4	Ζωοτροφές

2.4 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε και οι μικροβιακοί χειρισμοί που διενεργήθηκαν – σε κάθε περίπτωση υπό ασηπτικές συνθήκες – παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα ροής (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Διάγραμμα ροής των πειραματικών διαδικασιών που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη

2.4.1 Ανανέωση των μικροοργανισμών

Πρόκειται για το στάδιο εκείνο το οποίο μεσολαβεί πριν από τον ενοφθαλμισμό των μικροοργανισμών σε κάποιο υπόστρωμα, προκειμένου να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να καταστούν άμεσα έτοιμοι για ανάπτυξη. Η ανανέωση διαρκεί 18 – 24 ώρες οπότε και οι μικροοργανισμοί τοποθετούνται σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (Tryptic Soy Broth) με ακόλουθη επώαση σε θερμοκρασία 37°C. Συγκεκριμένα, εισάγεται ποσότητα ενοφθαλμίσματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν περίπου 10 ml TSB και ακολουθεί σε κάθε περίπτωση επώαση στους 37°C για 18 - 24 ώρες.

Προετοιμασία εμβολίων

Έγιναν δύο ανανεώσεις (υπό ασηπτικές συνθήκες):

- Η πρώτη περιλάμβανε λήψη κυττάρων *Salmonella* από την τράπεζα κυττάρων μικροοργανισμών του εργαστηρίου (stock) με τη χρήση κρίκου και την προσθήκη τους σε σωλήνες με 10 ml TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37°C για 24 h
- Η δεύτερη περιλάμβανε τη μεταφορά 100 μl από τους σωλήνες της πρώτης ανανέωσης σε σωλήνες που περιείχαν 10 ml TSB και εν συνεχεία επώαση στους 37 °C για 18 h
- Φυγοκέντρηση στις 3600 rpm για 12 min στους 4°C
- Εκπλύσεις για απομάκρυνση του θρεπτικού υποστρώματος και των μεταβολικών προϊόντων των μικροοργανισμών σε δοκιμαστικούς σωλήνες με προσθήκη 10ml Maximum Recovery Diluent (MRD) σε κάθε πλαστικό περιέκτη falcon.
- Τελική ανάμειξη των 5 στελεχών *Salmonella* με προσθήκη 2 ml από το κάθε στέλεχος με τελικό όγκο 10 ml σε πλαστικό περιέκτη falcon.

Πραγματοποιείται δειγματοληψία του τελικού εμβολίου σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες ύστερα από τον εμβολιασμό των Homogenates για την

εξακρίβωση του αρχικού πληθυσμού *Salmonella* σε τρυβλία με θρεπτικά υποστρώματα XLD και TSA.

2.4.2 Προετοιμασία και εμβολιασμός των Τροφικών Υπολειμμάτων (TY)

Παρασκευάστηκαν 5 homogenates, των οποίων η αναλογία και η σύσταση θα προσομοιώνουν τις πραγματικές συνθήκες κατά το πλύσιμο των περιεκτών συντήρησης τροφίμων όπου σε πιθανό σενάριο παραμένουν υπολείμματα τροφίμων πάνω στην επιφάνεια τους αν το πλύσιμο ήταν ελλιπές (Πίνακας 2.3).

Πίνακας 2.3 : Το σύνολο των τροφικών υπολειμμάτων που παρασκευάστηκαν και η σύσταση παρασκευής τους καθώς και η κωδική ονομασία τους

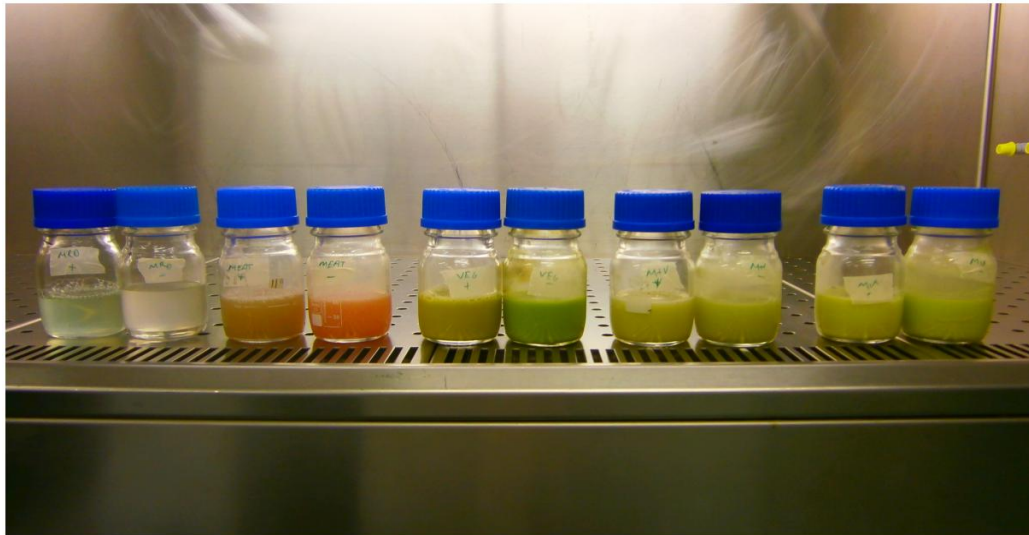
Τροφικά υπολείμματα	Κωδική ονομασία	Σύσταση (10% τρόφιμο, 5% ελαιόλαδο, 85% νερό)
Βόειος Κιμάς	BK	50 gr βόειος Κιμάς + 25 ml ελαιόλαδο + 425 gr αποστειρωμένο νερό
Μαρούλι	M	50 gr Μαρούλι + 25 ml ελαιόλαδο + 425 gr αποστειρωμένο νερό
Μαγιονέζα	ΜΓ	50 gr Μαγιονέζα + 25 ml ελαιόλαδο + 425 gr αποστειρωμένο νερό
Βόειος Κιμάς + Μαρούλι	BK + M	25 gr βόειος Κιμάς + 25 gr Μαρούλι + 25 ml ελαιόλαδο + 425 gr αποστειρωμένο νερό
Βόειος Κιμάς + Μαρούλι + Μαγιονέζα	Mix	25 gr βόειος Κιμάς + 25 gr Μαρούλι + 25 gr Μαγιονέζα + 37,5 ml ελαιόλαδο + 637,5 gr αποστειρωμένο νερό

Αυτά παρασκευάστηκαν με την ομογενοποίηση και πολτοποίηση των συστατικών τους για 1 λεπτό στο blender. Ύστερα φιλτραριστήκαν με τουλουπάνι από αποστειρωμένα επιθέματα γάζας για την απομάκρυνση των ογκωδέστερων υπολειμμάτων και με βοήθεια γυάλινου χωνιού συγκεντρώθηκαν ξεχωριστά σε κωνικές φιάλες των 250 ml (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Οι κωνικές φιάλες ύστερα από το φιλτράρισμα των διαφορετικών υπολειμμάτων, με την αντίστοιχη σειρά από τα αριστερά: Βόειος κιμάς, μαρούλι, Βόειος κιμάς + μαρούλι, Βόειος κιμάς+ μαρούλι + μαγιονέζα.

Στην συνέχεια, όπως φαίνεται και από τον παρακάτω πίνακα, χωριστήκαν σε δυο περιπτώσεις : α) με προσθήκη 0,5 ml απορρυπαντικού (εμπορικό απλό υγρό πιάτων) και β) χωρίς απορρυπαντικό, όπου και προστέθηκαν με γυάλινη πιπέτα 49 ml από το κάθε ΤΥ σε φιάλη duran των 100 ml για την πρώτη περίπτωση και 49,5 ml για την δεύτερη. Σαν μάρτυρες ετοιμάστηκαν 2 φιάλες duran με 49 ml και 49,5 ml MRD αντίστοιχα για την κάθε περίπτωση. Εμβολιάστηκαν με 0,5 ml από το cocktail των 5 στελεχών *Salmonella* όλες οι φιάλες duran με τα τροφικά υπολείμματα και το MRD (Εικόνα 2.2). Συνολικά δηλαδή παρασκευάστηκαν 12 φιάλες duran, οι 10 με τα ΤΥ (οι 5 χωρίς απορρυπαντικό και οι άλλες 5 περιείχαν διαλυμένο υγρό πιάτων) και οι 2 μάρτυρες με MRD (Πίνακας 2.4). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν καλή ανάδευση των μειγμάτων εντός των duran για την ομογενοποίηση τους. Ακολούθησε συντήρηση τους στους 25⁰ C για χρονικό διάστημα 24 ωρών.



Εικόνα 2.2: Οι φιάλες duran με τα διαφορετικά ενοφθαλισμένα υπολείμματα, ανά ζεύγη, όπου η αριστερή φιάλη σε κάθε ζεύγος περιέχει 0.5 ml απορρυπαντικό. Η αντίστοιχη σειρά από τα αριστερά: μάρτυρας-MRD, Βόειος κιμάς, μαρούλι, Βόειος κιμάς + μαρούλι, Βόειος κιμάς+ μαρούλι + μαγιονέζα.

Πίνακας 2.4 : Οι περιπτώσεις των εμβολιασμένων homogenate και control MRD που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες με τις τελικές τους συγκεντρώσεις

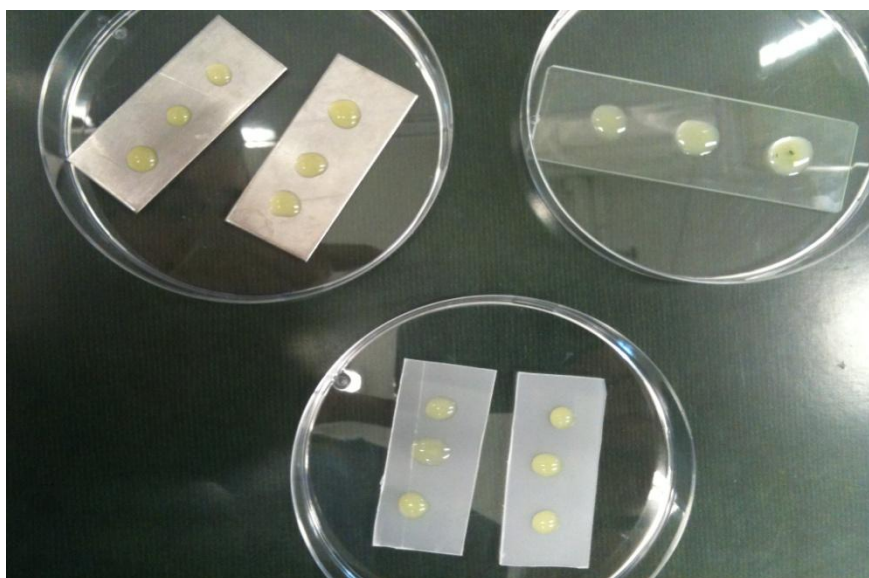
Περιπτώσεις	Ύπαρξη υγρού πιάτων	Τελικές συγκεντρώσεις
MRD	+	49 ml MRD + 0,5 ml soap + 0,5 ml inoculum
	-	49,5 ml MRD + 0,5 ml inoculum
5 Τροφικά Υπολείμματα (Βόειος κιμάς, μαρούλι, Μαγιονέζα Βόειος κιμάς + μαρούλι, Βόειος κιμάς+ μαρούλι + μαγιονέζα)	+	49 ml TY + 0,5 ml soap + 0,5 ml inoculum
	-	49,5 ml TY + 0,5 ml inoculum

2.4.3. Εμβολιασμός των επιφανειών με τα ενοφθαλισμένα TY

Έλαβαν μέρος τριών διαφορετικών ειδών επιφάνειες : γυάλινες, πλαστικές και μεταλλικές, όπως και στα κοινά είδη κουζίνακών σκευών συντήρησης τροφίμων

(μπολ). Οι επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε σχήμα ορθογωνίων κουπονιών (διαστάσεων 5x2 cm για τις μεταλλικές και πλαστικές επιφάνειες και 7,6 x 2,6 cm για τις γυάλινες). Πριν τον εμβολιασμό τους καθαρίζονταν και αποστειρώνονταν καταλλήλως.

Ο εμβολιασμός τους γινόταν με spot inoculation, όπου 100μl από το κάθε ΤΥ και τον μάρτυρα MRD, ανάλογα με την περίπτωση εμβολιαζόταν με την βοήθεια πιπέττας σε 3 σημεία κεντρικά του κάθε κουπονιού(Εικόνα 2.3). Αυτό πραγματοποιήθηκε με πρόθεση να προσομοιωθεί η τυχαία παραμονή σταγόνων με υπολείμματα τροφίμων πάνω στους οικιακούς περιέκτες τροφίμων συντήρησης τροφίμων ύστερα από το πλύσιμο τους.



Εικόνα 2.3: Ενοφθαλμισμένα κουπόνια με spot inoculation (3 διαφορετικά υλικά).

Αφού εμβολιαζόταν ο απαραίτητος αριθμός επιφανειών(2 δείγματα για κάθε περίπτωση), τοποθετούνταν εντός τρυβλίων ξεχωριστά για τη συντήρησή τους σε κλίβανο στους 25⁰ C για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Μετά τις 24 ώρες συντήρησης οι σταγόνες από τα homogenates ξηραίνονταν σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις.

Ύστερα από τον εμβολιασμό των κουπονιών πραγματοποιούνταν δειγματοληψία σε όλα τα homogenates και τους μάρτυρες με χρήση σαν αραιωτικό μέσο Ringer (LABM) και θρεπτικά υποστρώματα XLD και TSA. Επίσης, μετριόταν το pH τους σε πεχάμετρο.

2.4.4. Μέθοδοι ανάκτησης κυττάρων *Salmonella* από τις επιφάνειες

Για την τελική επιλογή της μεθόδου που θα εφαρμοζόταν για την ανάκτηση των κυττάρων *Salmonella* από τις επιφάνειες, που είχαν εμβολιαστεί με τα ενοφθαλμισμένα ΤΥ και το MRD, πραγματοποιηθήκαν δυο μέθοδοι που αναφέρονται παρακάτω:

A) Μέθοδος με beads και vortex

Κάθε κουπόνι κλεινόταν σε falcon των 50 ml, όπου περιείχε 35 ml MRD και 12 γυάλινα μπιλάκια (glass beads). Ύστερα ακολουθούσε έντονη ανάδευση σε vortex για 2 λεπτά, όπου τα beads ωθούσαν τα κουπόνια σε περιστροφικές κινήσεις εντός του περιέκτη με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων *Salmonella* από τις επιφάνειες τους και διάλυση τους στο MRD broth. Ύστερα από το πέρας των 2 λεπτών ακολουθούσε δειγματοληψία.

B) Μέθοδος swab με βαμβακοφόρους στυλεούς (cotton swabs)

Σε αυτήν την μέθοδο τα κύτταρα από τις κηλίδες των homogenates ανακτώνται με χρήση αποστειρωμένων βαμβακοφόρων στυλεών. Διαβρέχονται από το MRD που περιέχεται στο σωληνάκι έτσι ώστε να ενυδατωθεί το συσσωμάτωμα πάνω στις επιφάνειες και να αποκολληθούν με μεγαλύτερη ευκολία (συνήθως το συσσωμάτωμα των ΤΥ με τα κύτταρα *Salmonella* αποξηραίνονται ύστερα από την συντήρηση των 24 ωρών). Όμως παράλληλα αφού νοτιστεί συμπιέζεται στα πλάγια εσωτερικά τοιχώματα του φιαλιδίου μερικές φορές για κάθε μεριά του στυλεού έτσι ώστε αφαιρεθεί κάποια ποσότητα υγρού και να μην είναι πλήρως νοτισμένος (ISO 18593:2004). Ύστερα με σταθερής έντασης κινήσεις, ο βαμβακοφόρος στυλεός διέρχεται εφάπτοντας κατά μήκος όλης της επιφάνειας 10 φορές από την κάθε πλευρά της. Επανατοποθετείται στο σωληνάκι με τα 10 ml MRD και ακολουθεί ανάδευση για 1 λεπτό. Πραγματοποιείται δειγματοληψία.

Τελικά, επιλέχτηκε η δεύτερη μέθοδος με το swab για την ανάκτηση των κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού διότι τα αποτελέσματα που προέκυψαν (τα αποτελέσματα δεν παρατίθενται) ήταν πιο σταθερά σε σύγκριση με της πρώτης

μεθόδου (glass beads). Επίσης, αποκλείστηκε το homogenate της μαγιονέζας από τα επόμενα πειράματα διότι παρουσίαζε αισθητά μικρότερη επιβίωση (έως και 4 λογαρίθμους), επομένως και μηδαμινή ανάκτηση σε σχέση με τα υπόλοιπα ΤΥ και τους μάρτυρες (MRD). Αυτό οφείλεται στο χαμηλό του pH, του οποίου ο μέσος όρος ήταν 4 στο homogenate χωρίς το υγρό πιάτων και 4.95 σε αυτό με το υγρό πιάτων.

2.4.5. Ετοιμασία προ-μαγειρευμένων τροφίμων

Σε πρώτο πειραματικό στάδιο, διενεργήθηκε χειρισμός σε πραγματικά προ-μαγειρευμένα τρόφιμα για την παρακολούθηση της συμπεριφοράς του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella*, προερχόμενο από τις επιφάνειες και ακολούθως από τα homogenates, σύμφωνα με το σενάριο που έχει εφαρμοστεί και μελετάτε στην παρούσα μελέτη.

Τα τρόφιμα που παρασκευαστήκαν ήταν τρία: Α) Σάλτσα ντομάτας, Β) Μπιφτέκια από βόειο κιμά και Γ) Λαζάνια με κόκκινη σάλτσα. Η επιλογή τους έγινε με κριτήριο την σκληρότητα και την υδαρότητα της επιφάνειάς τους. Η σάλτσα ντομάτας είναι πλήρως υδαρής, τα μπιφτέκια είναι περισσότερο στεγνά (όχι όμως τελείως, διότι παρατηρούνται εκκρίσεις του κιμά από το ψήσιμο) και με σκληρή και τραχιά επιφάνεια ενώ τα λαζάνια παρουσιάζουν μεν σκληρή και σχεδόν λεία επιφάνεια αλλά έχουν υψηλότερη υδαρότητα λόγω της σάλτσας που προστέθηκε κατά την προετοιμασία τους.

Τα τρόφιμα ετοιμάστηκαν εντός του εργαστηριακού χώρου με χρήση οικιακού φούρνου και ηλεκτρικής εστίας κουζίνας. Για την παρασκευή του πρώτου τροφίμου, δηλαδή της μαγειρευμένης σάλτσας ντομάτας, η αναλογία ήταν 10/16 κοινή σάλτσα, 5/16 απιονισμένο νερό και 1/16 ελαιόλαδο. Τα υλικά τοποθετήθηκαν εντός μιας κοινής κατσαρόλας και ανακατευόντουσαν, όπου με την παροχή θερμότητας από την ηλεκτρική εστία της κουζίνας, η σάλτσα έβρασε για 30 λεπτά. Για το δεύτερο τρόφιμο, δηλαδή τα μπιφτέκια, τοποθετήθηκε σκέτος βόειος κιμάς σε ένα μεταλλικό ταψί με ομοιόμορφο πάχος (περίπου 2,5 cm) σε όλη την επιφάνεια του ταψιού. Ύστερα ψήθηκε σε προθερμασμένο φούρνο στους 200° C για 15 λεπτά (στα 7,5 λεπτά τα γυρνάμε πλευρά για το σωστό ψήσιμο τους). Αφού ετοιμάστηκε, κόπηκε σε ορθογώνια κομμάτια ίσων περίπου διαστάσεων με των κουπονιών που χρησιμοποιήθηκαν και βάρους 25 gr. Για το τελευταίο τρόφιμο, τα λαζάνια

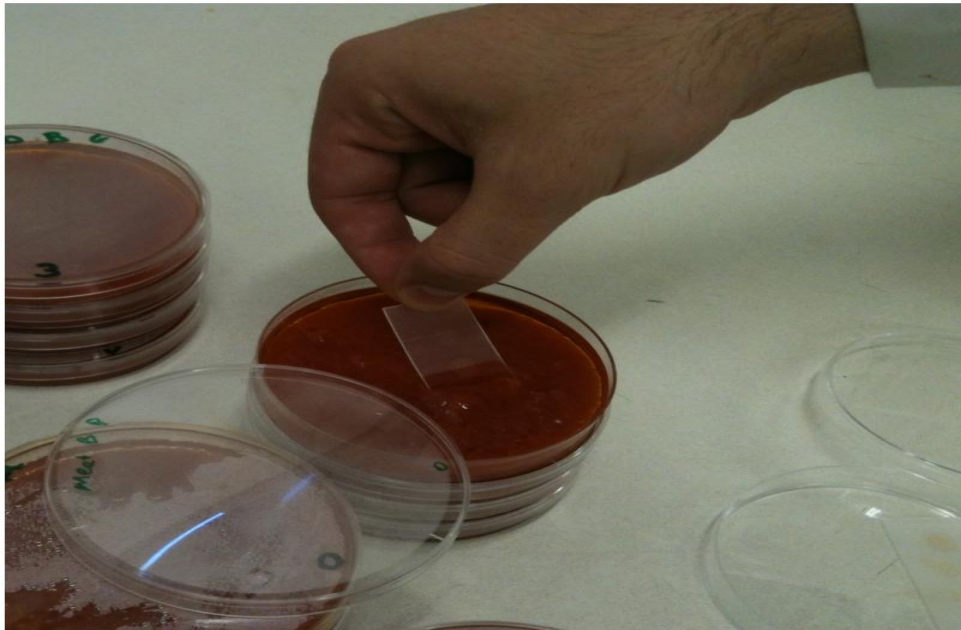
προστέθηκαν σε βρασμένο νερό για 5 λεπτά και αφού βράσανε, κοπήκαν σε ορθογώνια κομμάτια ίσων περίπου διαστάσεων με τα κουπόνια. Ύστερα, κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, τα λαζάνια εμβυθίζονταν στην σάλτσα ντομάτας που είχε παρασκευαστεί και ενδιάμεσα από δυο τεμάχια λαζανιών προστίθονταν 5 gr στρώση σάλτσας. Τέλος, όλα τα τρόφιμα μετά την ετοιμασία τους παρέμειναν στον χώρο για να εξισωθεί η θερμοκρασία τους με αυτής του περιβάλλοντος, πριν χρησιμοποιηθούν για τις πειραματικές διαδικασίες.

2.4.6. Άμεση επαφή των τροφίμων με τις επιφάνειες

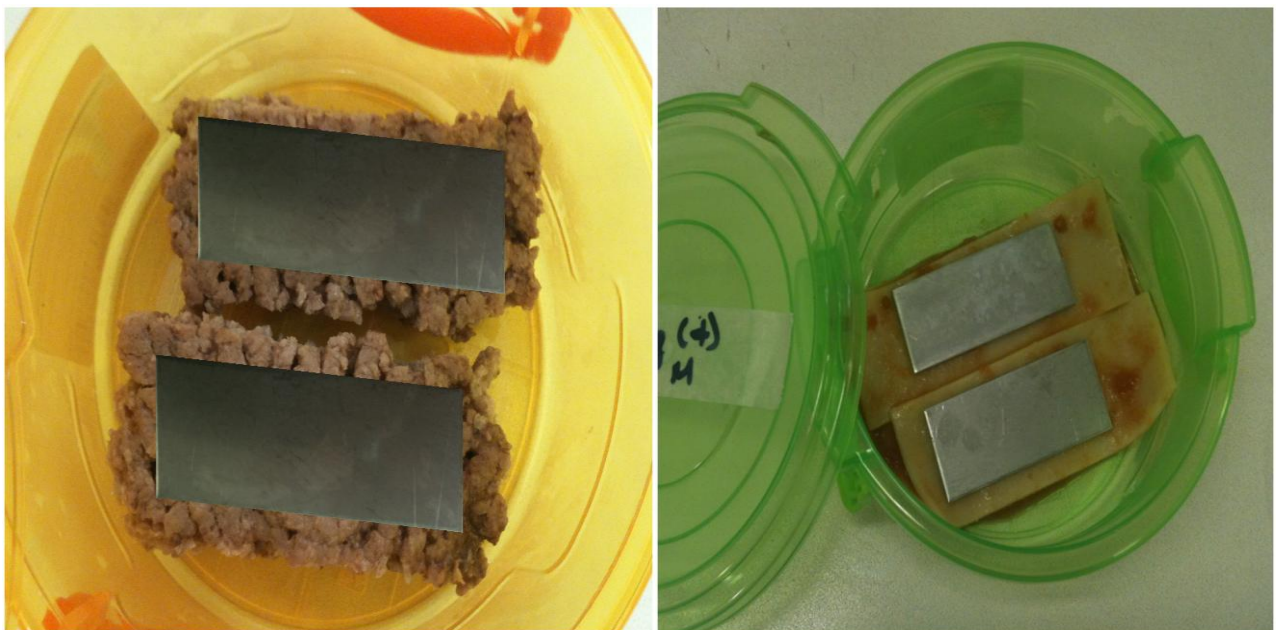
Αφού επιλέχτηκε η δεύτερη μέθοδος σαν πιο αξιόπιστη για την ανάκτηση των κυττάρων του μικροοργανισμού *Salmonella* από τις επιφάνειες πραγματοποιήθηκε ο χειρισμός με την απευθείας επαφή του τροφίμου με τα τρία είδη επιφανειών (πλαστικές, γυάλινες και μεταλλικές) που είχαν εμβολιαστεί, από τα 8 διαφορετικά ΤΥ και των δυο περιπτώσεων με MRD. Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά τρόφιμα, Α) Σάλτσα ντομάτας, Β) Μπιφτέκια από βόειο κιμά και Γ) Λαζάνια με κόκκινη σάλτσα.

Στο πρώτο τρόφιμο, τα κουπόνια εμβαπτίζονταν εντός τρυβλίων που περιείχαν 35 ml μαγειρευμένης σάλτσας ντομάτας (Εικόνα 2.4). Στο δεύτερο και τρίτο τρόφιμο, τα κουπόνια εφάπτονταν πάνω στα δείγματα με την εμβολιασμένη πλευρά προς τα κάτω (Εικόνα 2.5, 2.6). Όμως σε κάθε μπολ τοποθετούνταν βάρος 100 gr (τρυβλίο με μεταλλικές επιφάνειες και λίγο απιονισμένο νερό) πάνω από τα κουπόνια των δυο δειγμάτων που περιείχε κάθε μπολ. Άρα σε κάθε δείγμα μοιραζόταν 50 gr βάρους, βάρος το οποίο ορίστηκε λόγω της προσέγγισης του σε πραγματικό βάρος κάποιας μερίδας τροφίμου. Επιλέχτηκε αυτός ο τρόπος επαφής της επιφάνειας με το τρόφιμο, δηλαδή η εμβολιασμένη επιφάνεια να ακουμπά στην άνω πλευρά του τροφίμου και όχι το τρόφιμο να τοποθετείται πάνω της, για να έχουμε πιο τυποποιημένη και πρακτική μέθοδο.

Ύστερα, όλα τα δείγματα παρέμειναν στους 4^ο C για μια ώρα. Μετά το πέρας της μιας ώρας πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία για να μελετηθεί κατά πόσο όλοι οι παράμετροι που τέθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία επηρεάζουν την μεταφορά του παθογόνου μικροοργανισμού από την μολυσμένη επιφάνεια στο τρόφιμο μετά από την άμεση επαφή τους.



Εικόνα 2.4: Εμβάπτιση των ενοφθαλμισμένων επιφανειών εντός των τρυβλίων με τη σάλτσα τομάτας για την παραμονή τους στους 4°C για 1 ώρα.



Εικόνα 2.5 και 2.6: Επαφή της ενοφθαλμισμένης επιφάνειας των κουπονιών πάνω στα προ-μαγειρεμένα γεύματα (μπιφτέκι και λαζάνια με κόκκινη σάλτσα) για την παραμονή τους στους 4°C για 1 ώρα.

2.4.7. Μελέτη των παραμέτρων κινητικής με την συσκευή Bioscreen

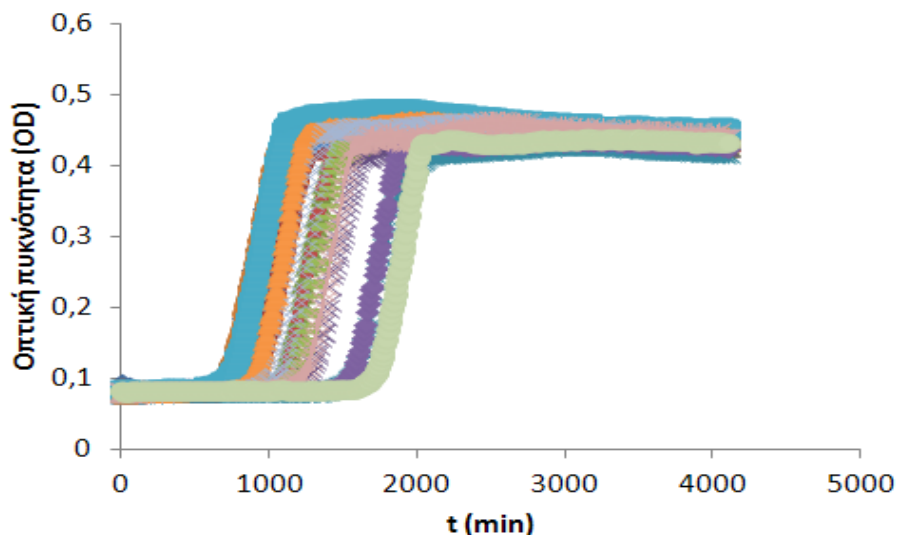
Σε δεύτερο πειραματικό στάδιο, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του ρυθμού αύξησης των (growth rate) παθογόνων μικροοργανισμών που προέρχονται από τις εμβολιασμένες επιφάνειες, με την χρήση της συσκευής Bioscreen C (Εικόνα 2.7).



Εικόνα 2.7: Η συσκευή Bioscreen C MBR που χρησιμοποιήθηκε κατά την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών.

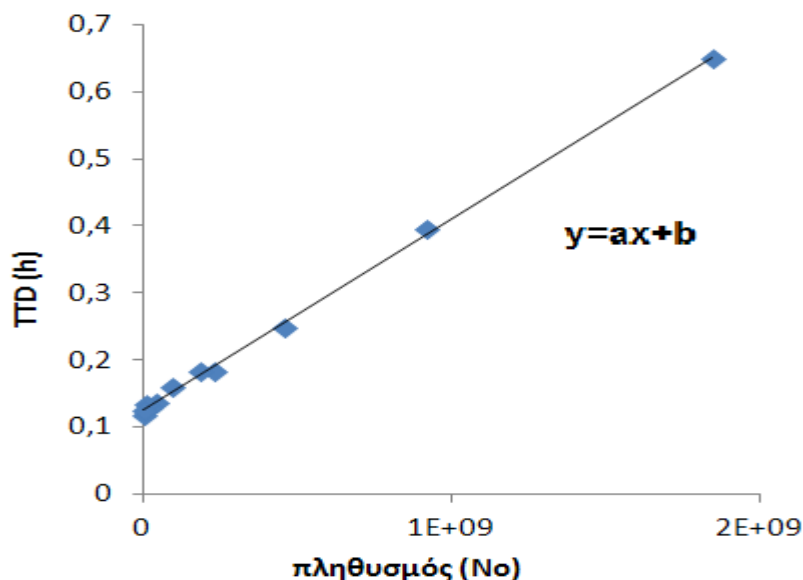
Το Bioscreen C MBR είναι μια ηλεκτρονικά ελεγχόμενη συσκευή η οποία επωάζει, «διαβάζει» και αναδύει τα micro-plates με τους μικροοργανισμούς που έχουμε «φορτώσει». Είναι εξοπλισμένη με 8 φίλτρα από 405 nm μέχρι 600 nm περιλαμβάνοντας ένα ευρέως φάσματος φίλτρο. Διαθέτει μια ευαίσθητη συσκευή που «διαβάζει» (reader) και μετρά την θολότητα, μια τεχνική πιο ευαίσθητη από το φασματοφωτόμετρο. Πραγματοποιεί επίσης μια γραμμική ανάδευση για να εξασφαλίσει την καλή ανάμειξη μέσα σε κάθε πηγαδάκι του micro-plate (10 x 10 πηγαδάκια). Τα micro-plates έχουν διάταξη κηρήθρας (Honeycomb), η οποία είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τον έλεγχο της θερμοκρασίας με εξαιρετική ακρίβεια. Έχει την δυνατότητα να εκτελέσει την μέτρηση σε δύο micro-plates, δηλαδή σε 200 δείγματα ταυτόχρονα. Χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των καθαρών και ανάμεικτων καλλιεργειών από βακτήρια και τον έλεγχο της επίδρασης ενός ή πολλών παραμέτρων όπως η θερμοκρασία και διάφορες χημικές ουσίες.

Η συσκευή μετράει και αποθηκεύει ανά τακτά χρονικά διαστήματα (στο συγκεκριμένο πείραμα κάθε 10 λεπτά) την οπτική πυκνότητα κάθε κελιού με το ενοφθαλμισμένο TSB (Γράφημα 2.1).



Γράφημα 2.1: Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας κάθε 10 λεπτά των διαφορετικών αραιώσεων μίας περίπτωσης (πχ. Meat +) από την επώαση στην συσκευή Bioscreen C σε συνάρτηση με τον χρόνο (min).

Ο χρόνος που θα φτάσει η οπτική πυκνότητα του κελιού, μετρώντας στα 600 nm, στην προκαθορισμένη τιμή (OD=0.2) είναι ο χρόνος TTD. Ύστερα γνωρίζοντας και τον αρχικό πληθυσμό κάθε κελιού, από τις δειγματοληψίες και τις αραιώσεις που έχουν προηγηθεί, συνδυάζουμε με τις τιμές του TTD για να ληφθεί το σχετικό γράφημα (Γράφημα 2.2).



Γράφημα 2.2: Μετρήσεις χρόνου (h) όταν η οπτική πυκνότητα των πληθυσμών (No) έγινε ίση με 0.2 (TTD) ύστερα από την επώαση τους στα διαφορετικά βιοπλάκες των microplates. Η γραμμή τάσης μας δίνει την εξίσωση $y=ax+b$.

Οι τιμές TTD, N_0 είναι γνωστές και η τιμή N_{Det} βρίσκεται από την εξίσωση:

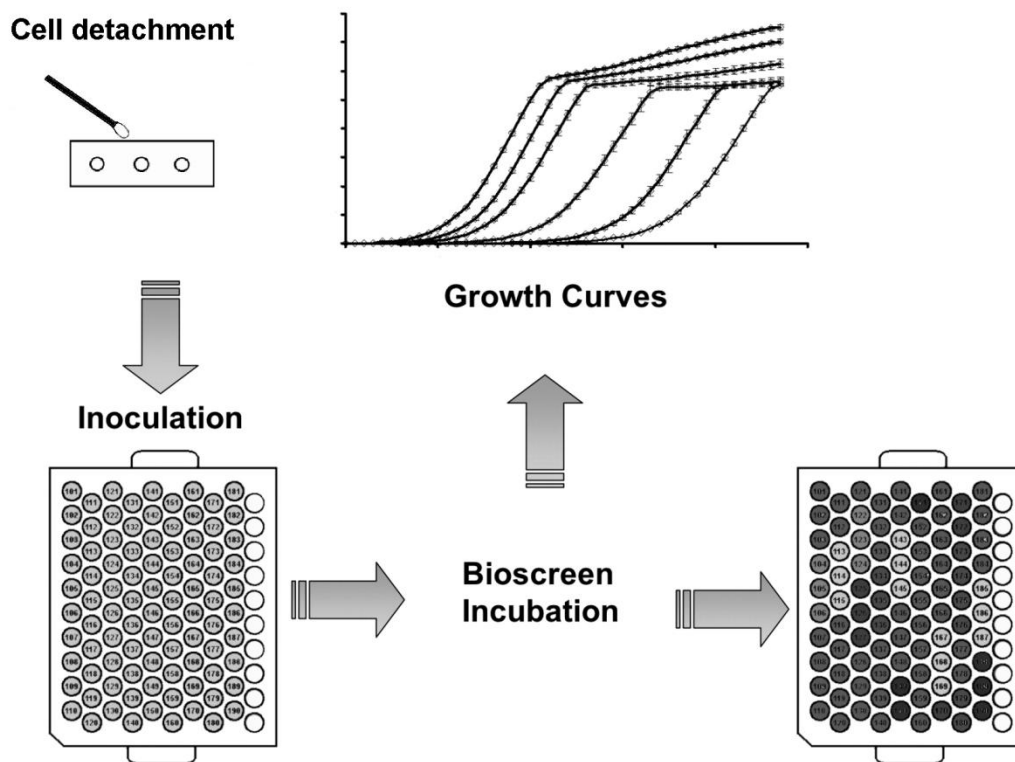
$$N_{Det} = \frac{0.2 - b}{a}$$

Όπου a και b λαμβάνονται από την εξίσωση της ευθείας στο Γράφημα 2.2. Η τιμή N_{Det} ισούται με τον πληθυσμό όταν $DDT=0$ και η οπτική πυκνότητα στο βοθρίο είναι η προκαθορισμένη ($OD=0.2$), δηλαδή είναι η τιμή του πληθυσμού (N_0) όταν η ευθεία προεκτεινόμενη συναντήσει τον άξονα x , με $y=0$. Σαν N_{Det} στους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε το N_{Det} που μετρήθηκε για το μείγμα των 5 στελεχών του παθογόνου ύστερα από την επώαση στο Bioscreen, πριν την διεξαγωγή των υπόλοιπων πειραμάτων.

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ένα μαθηματικό μοντέλο για τον υπολογισμό του μ_{max} και του χρόνου προσαρμογής (t_λ). Το μοντέλο αυτό υπολογίζει την τιμή του TTD, ελαχιστοποιώντας το άθροισμα των ελαχίστων τετραγώνων των παρατηρούμενων τιμών και των τιμών του μοντέλου, μέσω της ταυτόχρονης μεταβολής των δύο παραμέτρων κινητικής (μ_{max} και t_λ).

$$TTD_{model} = t_\lambda + \frac{\ln \frac{N_{Det}}{N_0}}{\mu_{max}}$$

Όσον αφορά το πειραματικό μέρος, αφού έχει προηγηθεί η συντήρηση της οποιαδήποτε επιφάνειας που πρόκειται να τεθεί προς ανάλυση στο Bioscreen για 24 ώρες τότε συλλέγεται από τον κλίβανο των 25^0 C και με τη μέθοδο swab ανακτώνται τα κύτταρα *Salmonella* πάνω από την κάθε επιφάνεια για να επωαστούν στην συσκευή στους 25^0 C για 48 ώρες και να αναλυθούν οι παράμετροι κινητικής του μικροοργανισμού (Εικόνα 2.8).



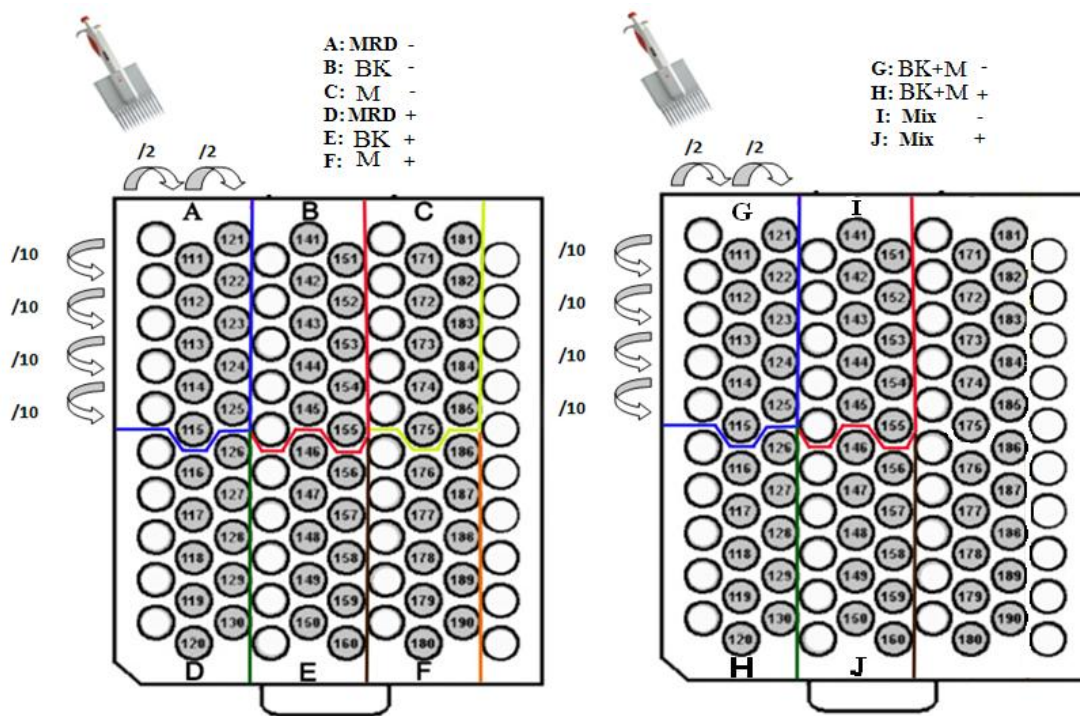
Εικόνα 2.8 : Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας που έλαβε μέρος για την μελέτη της κινητικής του μικροοργανισμού σε Bioscreen.

Παρακάτω παρατίθεται η πειραματική διαδικασία αναλυτικότερα με όλα τα στάδια και τις διενέργειες που πραγματοποιήθηκαν. Κατ' αρχάς, παρασκευάστηκε υγρό θρεπτικό διάλυμα TSB με περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο (NaCl) 2% και pH 5,5. Το pH για να φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο ρυθμίστηκε με γαλακτικό οξύ σε πεχάμετρο με αποστειρωμένες συνθήκες. Τόσο το pH και η περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο όσο και η χρήση γαλακτικού οξέος, ενός οξέος που συναντάται σε τρόφιμα και όχι ενός ανόργανου οξέος, επιλεχτήκαν για να προσομοιώνουν τα χαρακτηριστικά ενός πραγματικού τροφίμου. Το ρυθμισμένο TSB χρησιμοποιείται τόσο στους δοκιμαστικούς σωλήνες όσο και στα πηγαδάκια των micro-plates. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν τους βαμβakoφόρους στυλεούς τοποθετούνται 5 ml TSB.

Το micro-plate που αποτελείται από 10 γραμμές και από 10 στήλες πηγαδάκια (σύνολο 100 πηγαδάκια), χωρίστηκε σε 3 ομάδες με 3 στήλες η καθεμία. Επίσης, η κάθε ομάδα χωρίζεται στα δύο. Έτσι, συνολικά σε κάθε micro-plate αναλύθηκαν 6

περιπτώσεις(η κάθε περίπτωση αντιστοιχεί σε ένα TY). Από την κάθε ομάδα, η πρώτη στήλη έμεινε άδεια ενώ οι επόμενες δυο γεμίζονταν με 200 μl από το TSB με την βοήθεια της πολυπιπέτας.

Στην συνέχεια, ακολουθεί η διαδικασία με το swab, όπως περιγράφηκε παραπάνω με την διαφορά ότι ο βαμβακοφόρος στυλεός εμποτίζεται στο TSB και όχι σε MRD. Γίνεται η καθορισμένη τριβή πάνω στην επιφάνεια των κουπονιών για την αποκόλληση και ανάκτηση των κυττάρων *Salmonella* και στην συνέχεια εμβαπτίζεται μέσα στο σωληνάκι με τα 5 ml TSB για να ακολουθήσει ανάδευση σε συσκευή vortex για 1 λεπτό. Ύστερα γίνονται κάποιες δεκαδικές αραιώσεις πάλι σε σωληνάκια που περιέχουν 9 ml TSB, με τον αριθμό των αραιώσεων να διαφέρει ανάλογα με την περίπτωση. Από τις τελευταίες 5 αραιώσεις της μίας περίπτωσης (π.χ. το Meat + soap) «φορτώνεται» και ένα πηγαδάκι αντίστοιχα από την 1^η μέχρι το 5^η γραμμή με 400 μl TSB, με την 1^η να αποτελεί την μικρότερη αραιώση. Το ίδιο συμβαίνει και για τις επόμενες 5 περιπτώσεις που χωράνε σε ένα micro-plate. Αφού συμπληρωθούν όλες οι στήλες με τα κενά πηγαδάκια από τα 400 μl TSB που τους αντιστοιχούν, τότε με την βοήθεια πολυκάναλης πιπέτας μεταφέρονται ταυτόχρονα 200 μl από την 1^η στήλη με τα δέκα πηγαδάκια στην 2^η στήλη και από την 2^η στην 3^η στήλη άλλα 200μl. Ανάμεσα από την κάθε δυαδική αραιώση γίνεται μια ανάδευση με την πολυπιπέτα. Από την τελευταία στήλη απορρίπτονται 200 μl TSB, για να έχουμε τελικά 200 μl σε όλα τα πηγαδάκια. Έτσι με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιούνται 2 δυαδικές αραιώσεις για το κάθε πηγαδάκι της πρώτης στήλης. Τελικά έχουμε για την κάθε περίπτωση από τις συνολικά 6 περιπτώσεις που φορτώσαμε στο micro-plate 5 δεκαδικές αραιώσεις με 2 δυαδικές αραιώσεις αντίστοιχα για κάθε μια από αυτές. Η συσκευή όμως χωράει 2 micro-plates, με αποτέλεσμα σε μια λειτουργία του Bioscreen να μελετούνται και οι 10 περιπτώσεις (8 TY και 2 μάρτυρες-MRD) για το κάθε είδος επιφάνειας που μας ενδιαφέρουν (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9: Τα δυο micro-plates με τις 10 περιπτώσεις, (2 μάρτυρες-MRD και 8 τροφικά υπολείμματα) όπου κάθε γράμμα (A-J) αντιστοιχεί σε κάθε περίπτωση (+ : παρουσία απορρυπαντικού, - : χωρίς απορρυπαντικό). Σε κάθε περίπτωση στην πρώτη στήλη είχαμε 5 δεκαδικές αραιώσεις (από πάνω προς τα κάτω), όπου σε καθεμία από αυτές ακολουθούσαν δυο δυαδικές αραιώσεις με την βοήθεια πολυπιπέττας, έχοντας σε όλα τα βοθρία στο τέλος 200 μl ενοφθαλμισμένου TSB (pH 5.5, NaCl 2%).

Επιπλέον, διενεργήθηκε μελέτη στο Bioscreen των 5 στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella*, ξεχωριστά για το κάθε στέλεχος, για να συγκριθούν οι κινητικές παράμετροι τους στις συνθήκες stress που υποβλήθηκαν (pH 5,5 και NaCl 2%) στους 25⁰ C.

Για το κάθε είδος επιφάνειας πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις, με ένα δείγμα τη φορά από κάθε περίπτωση για την παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξης των μικροοργανισμών στο Bioscreen ενώ για την δειγματοληψία εκτελέστηκαν και οι 2 επαναλήψεις, με δυο δείγματα (A και B). Το πρώτο ήταν κοινό με αυτό που μελετήθηκε στο Bioscreen, ενώ το δεύτερο ήταν άλλο δείγμα του οποίου ο δοκιμαστικός σωλήνας με τον βαμβακοφόρο στυλεό περιείχε 10 ml Ringer. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με θρεπτικά υποστρώματα XLD και TSA.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Υπολείμματα τροφίμων

Το αρχικό εμβόλιο με το μείγμα από τα 5 στελέχη *Salmonella* που χρησιμοποιήσαμε είχε πληθυσμό 10^8 cfu/ml (8 log), ενώ ο τελικός πληθυσμός των κυττάρων στα ενοφθαλμισμένα υπολείμματα των τροφίμων ήταν 6 log cfu/ml. Κατά την επώαση των υπολειμμάτων στους 25°C για 24 ώρες παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού του παθογόνου περίπου κατά 2 λογαρίθμους, εκτός από την περίπτωση της μαγιονέζας όπου το χαμηλό pH του σκευάσματος δεν επέτρεψε την αύξηση του εμβολιασμένου παθογόνου, αλλά αντιθέτως σημειώθηκε μείωση (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1 : Πληθυσμοί του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. εντός των υπολειμμάτων τροφίμων πριν και μετά από συντήρηση στους 25° C για 24 ώρες. (- : χωρίς απορρυπαντικό, + : με απορρυπαντικό)

Υπολείμματα	Πριν από συντήρηση	Μετά από συντήρηση (25°C / 24h)
MRD (-)		7.1 ± 0.2
MRD (+)		6.9 ± 0.1
BK (-)		7.4 ± 0.2
BK (+)		7.2 ± 0.3
M (-)		6.7 ± 0.3
M (+)	6.2 ± 0.1	6.8 ± 0.5
MΓ (-)		1.2 ± 1.5
MΓ (+)		3.9 ± 1.7
BK + M (-)		6.4 ± 0.7
BK + M (+)		7.1 ± 0.3
Mix (-)		6.1 ± 1.0
Mix (+)		7.0 ± 0.3

Όσον αφορά στο pH των σκευασμάτων, παρατηρήθηκε πτώση του με το πέρας της 24ωρης επώασης τους, γεγονός που οφείλεται στην δράση των μικροοργανισμών που εμβολιάσαμε αλλά και στους ήδη υπάρχοντες. Επίσης, η προσθήκη απορρυπαντικού (υγρό πιάτων) είχε σαν αποτέλεσμα τα σκευάσματα

υπολειμμάτων να έχουν μεγαλύτερο αρχικό pH (περίπου μια μονάδα) από τα αντίστοιχα χωρίς το απορρυπαντικό (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2: Τιμές pH των υπολειμμάτων τροφίμων πριν και μετά το πέρας των 24 ωρών στους 25° C

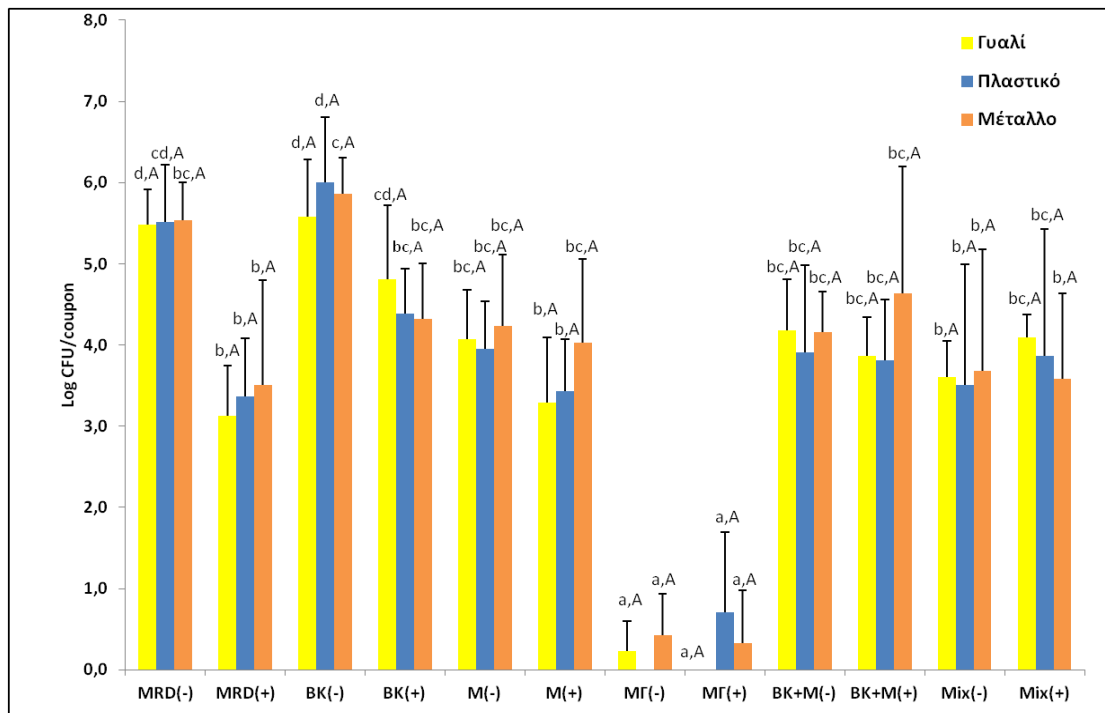
Υπολείμματα	Αρχικό pH	Τελικό pH
MRD (-)	6.81 ± 0.15	6.87 ± 0.09
MRD (+)	7.71 ± 0.06	7.29 ± 0.13
BK (-)	6.00 ± 0.08	5.79 ± 0.16
BK (+)	6.86 ± 0.16	6.10 ± 0.53
M (-)	6.22 ± 0.07	4.78 ± 0.28
M (+)	7.72 ± 0.05	5.02 ± 0.31
ΜΓ (-)	4.01 ± 0.09	4.00 ± 0.07
ΜΓ (+)	4.98 ± 0.08	4.95 ± 0.06
BK + M (-)	5.91 ± 0.03	4.98 ± 0.42
BK + M (+)	6.94 ± 0.08	5.52 ± 0.36
Mix (-)	5.23 ± 0.11	4.63 ± 0.15
Mix (+)	6.35 ± 0.53	5.24 ± 0.57

3.2 Ανάκτηση από τις επιφάνειες

Τα κύτταρα ανακτήθηκαν από τις επιφάνειες των 3 υλικών (πλαστικό, γυαλί και μέταλλο) με την μέθοδο swab, όπου με την χρησιμοποίηση αποστειρωμένων βαμβακοφόρων στυλεών πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από τα ενοφθαλμισμένα κουπόνια που είχαν συντηρηθεί για 24 ώρες στους 25° C. Η παρουσία του απορρυπαντικού δεν ευνόησε την ανάκτηση του παθογόνου, κυρίως στην περίπτωση του μάρτυρα (MRD). Η επίδραση του απορρυπαντικού γίνεται πιο έντονη στον μάρτυρα διότι στερείται των τροφικών υπολειμμάτων που περιέχονται στα υπόλοιπα δείγματα που μελετήθηκαν. Η οργανική ύλη, όπως τα υπολείμματα τροφίμων, είναι γνωστό ότι προστατεύουν τα βακτήρια από την άμεση επαφή με τη θερμότητα ή τα απορρυπαντικά πιάτων που χρησιμοποιούνται κατά το πλύσιμο των σκευών κουζίνας (Kusumaningrum *et al.*, 2002; Line *et al.*, 1991). Επιπλέον συμπεραίνεται ότι το χρησιμοποιηθέν απορρυπαντικό στον μάρτυρα (MRD) εμφάνισε βακτηριοκτόνο δράση, λόγω της μείωσης κατά 2.5 log CFU/coupon σε σύγκριση με τον αντίστοιχο

μάρτυρα (MRD) χωρίς την προσθήκη απορρυπαντικού. Το φαινόμενο της επίδρασης του απορρυπαντικού ενδέχεται να ενισχύεται από την ξήρανση των τροφικών υπολειμμάτων στον αέρα για 24 ώρες διότι χάνεται κάποιο ποσοστό υγρού σε αυτήν την χρονική περίοδο, γεγονός που έγινε ορατό επίσης πάνω στην επιφάνεια των κουπονιών, με αποτέλεσμα να συμπυκνώνεται το εμβολιασμένο εκχύλισμα και να αυξάνεται η περιεκτικότητα του απορρυπαντικού. Συνδυαστικά με την μείωση της ενεργότητας νερού (a_w), της οποίας η μείωση είναι γνωστό ότι αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην ανάπτυξη των βακτηρίων, η αύξηση της περιεκτικότητας σε απορρυπαντικό κατά την 24ωρη ξήρανση στον αέρα είναι πιθανό να αύξησε με το πέρασ του χρόνου την επίδραση του απορρυπαντικού και να έφερε μεγαλύτερη μείωση των πληθυσμών του βακτηρίου. Παρόμοια αποτελέσματα στην μείωση των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών έχουν δείξει και παλαιότερες έρευνες σχετικές με την επίδραση απορρυπαντικών (Erdogrul *et al.*, 2006; Jaesung Lee *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2002; Kusumaningrum *et al.*, 2001). Πρόσφατη έρευνα από τους Panagiotakis *et al.*, (2012) έδειξε μείωση του *L. monocytogenes* κατά 1.7-2.1 log CFU/g και του παθογόνου *Salmonella* κατά 0.7-1.4 log CFU/g με την παρουσία κοινού απορρυπαντικού (1% w/v) μετά την πάροδο 24 ωρών και παραμονή τους σε νοτισμένους και ενοφθαλμισμένους κοινούς σπόγγους σε θερμοκρασία 20° C.

Αντίθετα το απορρυπαντικό δεν επηρέασε σημαντικά τους πληθυσμούς που ανακτήθηκαν στα υπόλοιπα υπολείμματα (Γράφημα 3.1). Παράλληλα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην ανάκτηση του παθογόνου από τις επιφάνειες των διαφορετικών υλικών, αποδεικνύοντας πως δεν έπαιξε σημαντικό ρόλο το είδος της επιφάνειας στην αποκόλληση των κυττάρων *Salmonella* από τα συσσωματώματα των υπολειμμάτων, που είχαν αφεθεί για 24 ώρες στους 25° C πάνω στα κουπόνια. Στις επιφάνειες με τα υπολείμματα από μαγιονέζα δεν παρατηρήθηκε σημαντική ανάκτηση (<0.7 log CFU/coupon), που πιθανόν οφείλεται στην θανάτωση του μικροοργανισμού από την καταπόνηση λόγω του χαμηλού pH του υπολείμματος. Όσο αφορά την επίδραση των τροφικών υπολειμμάτων στην ανάκτηση, μεγαλύτερη ανάκτηση παρατηρήθηκε στα τροφικά υπολείμματα από βόειο κιμά (BK) και στον μάρτυρα (MRD), ενώ στα υπόλοιπα υπολείμματα είχαμε ίδια επίπεδα ανάκτησης (εκχυλίσματα από: μαρούλι, μαρούλι + βόειος κιμάς, μαρούλι + βόειος κιμάς + μαγιονέζα), με τα τελευταία δυο να εμφανίζουν μεγαλύτερη τυπική απόκλιση λόγω της επίδρασης πληθώρας παραγόντων στην ανάκτηση.



Γράφημα 3.1: Ανακτήσεις από τις επιφάνειες των κουπονιών με υπολείμματα τροφίμων που είχαν ενοφθαλμιστεί με πληθυσμό *Salmonella* περίπου 7 log cfu/coupon. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τροφικών υπολειμμάτων του ίδιου υλικού επιφάνειας ενώ τα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υλικών στο ίδιο τροφικό υπόλειμμα σύμφωνα με το Tukey HSD test ($p < 0.05$).

3.3 Επίδραση διάφορων παραγόντων στην μεταφορά κυττάρων από την άμεση επαφή επιφάνειας τροφίμου

3.3.1 Επίδραση από το είδος τροφίμου

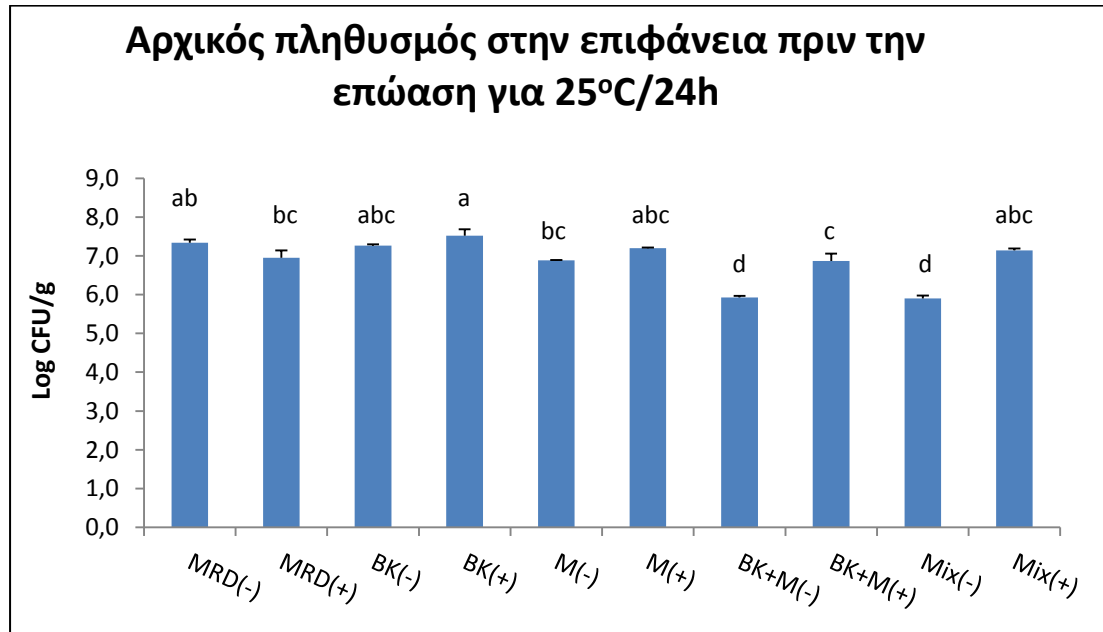
Ο αρχικός πληθυσμός του παθογόνου πάνω στις επιφάνειες πριν την επώαση τους στους 25°C για 24 ώρες κυμαινόταν από 5.9-7.5 log CFU/g (Γράφημα 3.2). Από την άμεση επαφή των ενοφθαλμισμένων επιφανειών με τα 3 είδη τροφίμου για 1 ώρα προέκυψε ότι το είδος του τροφίμου έχει επίδραση στο ποσοστό μεταφοράς κυττάρων *Salmonella* από την επιφάνεια προς το τρόφιμο. Παρατηρήθηκε σε γενικές γραμμές μεγαλύτερο ποσοστό μεταφοράς του παθογόνου στα λαζάνια (1.6 – 3.6 log CFU/g) σε σχέση με τα άλλα δύο τρόφιμα (Γραφήματα 3.3, 3.4 και 3.5). Δεύτερο τρόφιμο σε

ποσοστό ανάκτησης από τις επιφάνειες διακρίθηκαν τα μπιφτέκια (0.4-1.4 log CFU/g) και τρίτο η σάλτσα ντομάτας (0.5-2.2 log CFU/g). Σε αυτά τα αποτελέσματα συνετέλεσαν, υποθετικά, η υδαρότητα των τροφίμων και το ποσοστό τριβής κατά την επαφή τους με τα ενοφθαλμισμένα υπολείμματα.

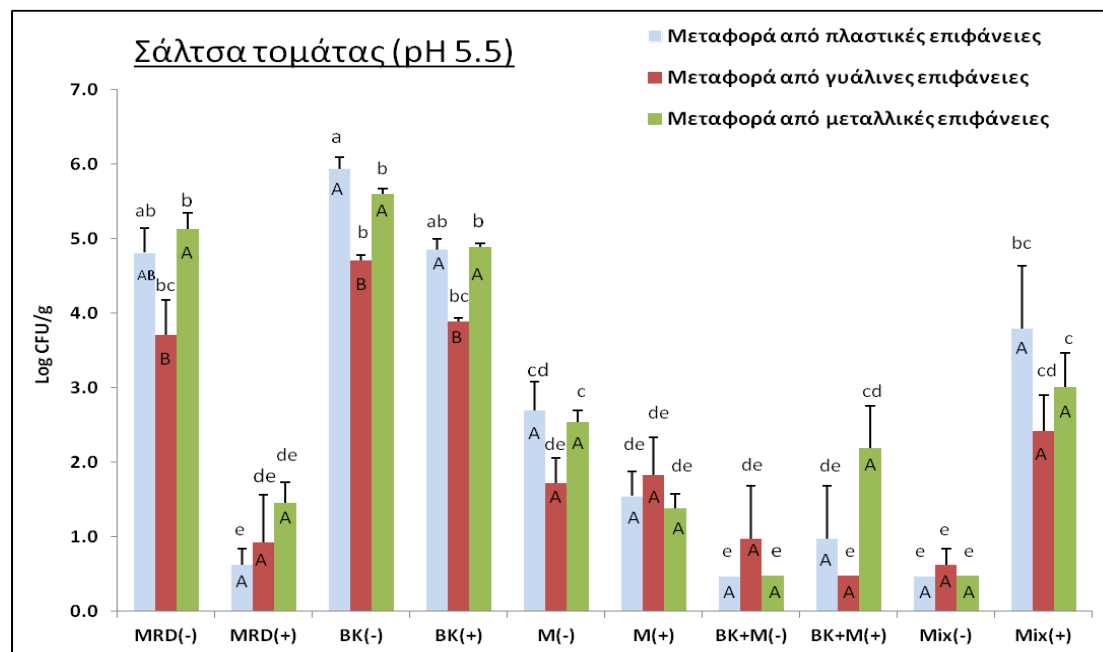
Όταν τα υπολείμματα τροφίμων, τα οποία είχαν αφεθεί σε θερμοκρασία 25° C για να στεγνώσουν με τον αέρα για χρονική διάρκεια 24 ωρών, έρθουν σε επαφή με την υγρή φάση του τροφίμου, τότε ενυδατώνονται οι ιστοί τους. Αυτή η υγρασία μπορεί να προκαλέσει καλύτερη αποκόλληση των κυττάρων *Salmonella*, με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο ποσοστό μεταφοράς του βακτηρίου στα τρόφιμα. Παρομοίως, έχει αποδειχτεί ότι η επιπρόσθετη υγρασία διευκολύνει την μεταφορά από μολυσμένο ανοξείδωτο χάλυβα (Kusumaningrum *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2003). Ο δεύτερος παράγοντας που θεωρήθηκε ως υπεύθυνος για τα αποτελέσματα είναι η τριβή που αναπτύχθηκε μεταξύ των στερεών τροφίμων και των επιφανειών με τα υπολείμματα, όταν αυτά ήρθαν σε επαφή κατά την διάρκεια του πειράματος. Η τριβή και η πίεση μεταξύ των επιφανειών μπορεί μηχανικά να απελευθερώσει υπολείμματα που περιέχουν εγκλωβισμένα βακτήρια, έτσι ώστε να ωθείται η μεταφορά στην άλλη επιφάνεια. Παρόμοια, η μελέτη από τους Vorst *et al.* (2004, 2006) έδειξε μια φαινομενικά θετική επίδραση της πίεσης στην βακτηριακή μεταφορά, η οποία είναι επίσης σύμφωνη με τα πορίσματα των Kusumaningrum *et al.* (2002) και Moore και Griffith (2002). Στην ουσία, η τριβή και η πίεση μειώνει τις αποστάσεις μεταξύ των επιφανειών, οδηγώντας σε πιθανές συνενώσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφάνειας και του μικροβιακού στρώματος (biofouling layer). Με βάση το μηχανισμό της βακτηριακής προσκόλλησης που προτάθηκε από τους Bower, McGuire, και Daeschel (1996), μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αύξηση στην πίεση ωθεί τις επιφάνειες πιο κοντά, αποφεύγοντας τις αρχικές δυνάμεις απόθησης (50nm απόσταση) και ενεργοποιώντας τις ελκτικές δυνάμεις δεσμού (απόσταση 20nm) και περισσότερες ειδικές αλληλεπιδράσεις (απόσταση <1,5 nm).

Σύμφωνα με αυτούς τους δύο παράγοντες, τα λαζάνια στα οποία είναι παρόντες και οι δύο παράγοντες, σημείωσαν την υψηλότερη μεταφορά από όλες τις επιφάνειες διότι, αφενός είναι στερεό τρόφιμο αλλά αφετέρου είχε προστεθεί και σάλτσα ντομάτας που τους προσδίδει υδαρότητα. Αντίθετα τα μπιφτέκια παρουσιάζουν μόνο τον δεύτερο παράγοντα, την μηχανική τριβή, διότι είναι στέρεο τρόφιμο αλλά εμφανίζουν πιο στεγνή επιφάνεια με χαμηλή ενεργότητα νερού (a_w). Το

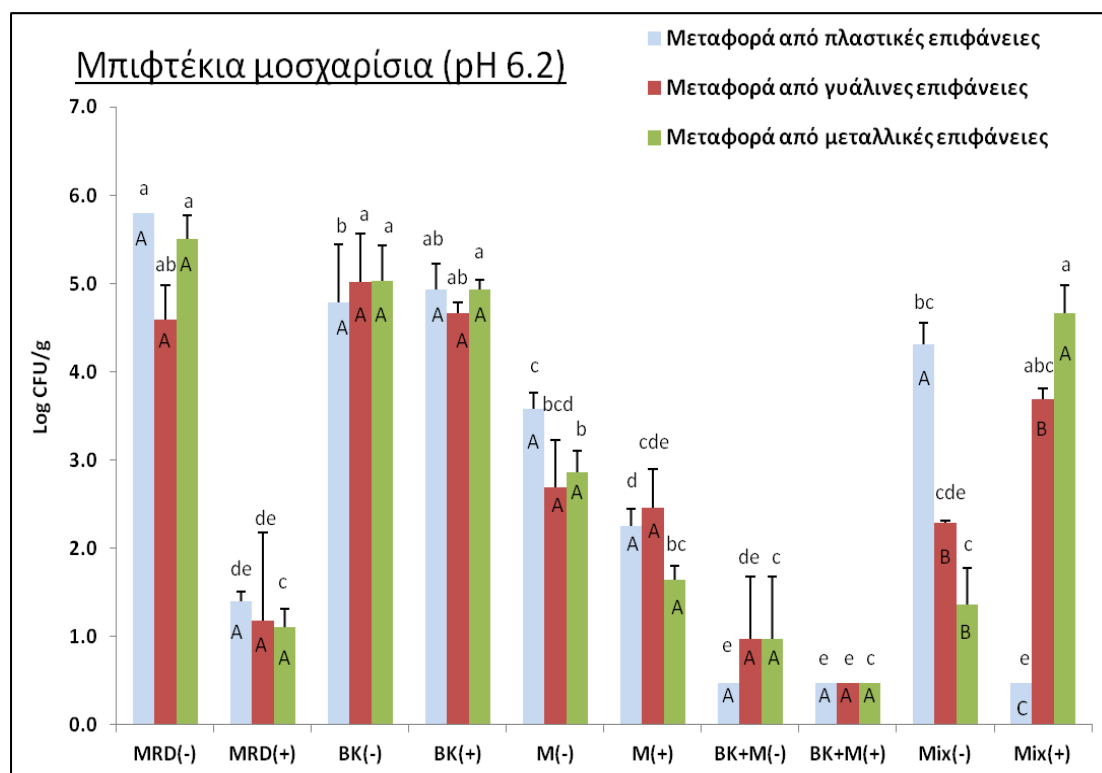
τρίτο τρόφιμο, η σάλτσα ντομάτας, τελευταίο σε ποσοστό μεταφοράς κυττάρων του παθογόνου εμφανίζει μόνο τον παράγοντα της υδαρότητας, όπου αφενός ενυδατώνει τους ιστούς των υπολειμμάτων με τα κύτταρα, αφετέρου δεν ασκείται τριβή και πίεση για να διευκολυνθεί η μεταφορά στο υγρό μέσο.



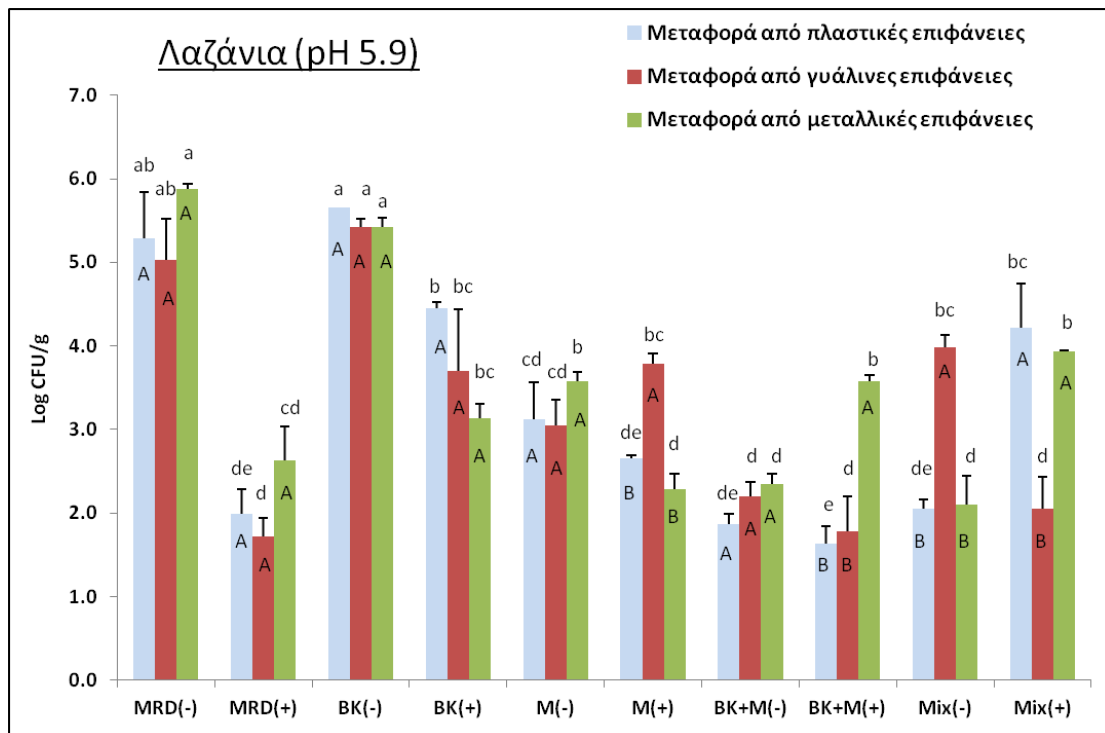
Γράφημα 3.2: Ο αρχικός πληθυσμός του παθογόνου *Salmonella* spp. πάνω στην επιφάνεια του κουπονιού για τα 4 είδη τροφικών υπολειμμάτων και του μάρτυρα MRD, με (+) και χωρίς (-) προσθήκη απορρυπαντικού, πριν την επώαση στους 25°C για 24 ώρες. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τροφικών υπολειμμάτων σύμφωνα με το Tukey HSD test ($p < 0.05$).



Γράφημα 3.3: Μεταφορά πληθυσμού *Salmonella* (log CFU/g) ενοφθαλμισμένου σε 4 είδη τροφικών υπολειμμάτων και του μάρτυρα MRD, με (+) και χωρίς (-) προσθήκη απορρυπαντικού, από τα 3 διαφορετικά υλικά επιφανειών προς την σάλτσα ντομάτας. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τροφικών υπολειμμάτων του ίδιου υλικού επιφάνειας ενώ τα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υλικών στο ίδιο τροφικό υπόλειμμα σύμφωνα με το Tukey HSD test ($p < 0.05$).



Γράφημα 3.4: Μεταφορά πληθυσμού *Salmonella* (log CFU/g) ενοφθαλμισμένου σε 4 είδη τροφικών υπολειμμάτων και του μάρτυρα MRD, με (+) και χωρίς (-) προσθήκη απορρυπαντικού, από τα 3 διαφορετικά υλικά επιφανειών προς τα μοσχάρια μπιφτέκια. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τροφικών υπολειμμάτων του ίδιου υλικού επιφάνειας ενώ τα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υλικών στο ίδιο τροφικό υπόλειμμα σύμφωνα με το Tukey HSD test ($p < 0.05$).



Γράφημα 3.5: Μεταφορά πληθυσμού *Salmonella* (log CFU/g) ενοφθαλμισμένου σε 4 είδη τροφικών υπολειμμάτων και του μάρτυρα MRD, με (+) και χωρίς (-) προσθήκη απορρυπαντικού, από τα 3 διαφορετικά υλικά επιφανειών προς τα λαζάνια. Οι γραμμές σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση. Τα διαφορετικά πεζά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τροφικών υπολειμμάτων του ίδιου υλικού επιφάνειας ενώ τα κεφαλαία γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υλικών στο ίδιο τροφικό υπόλειμμα σύμφωνα με το Tukey HSD test ($p < 0.05$).

3.3.2 Επίδραση από το είδος της επιφάνειας

Στα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη τάση από την επίδραση των τριών διαφορετικών υλικών (πλαστικό, ανοξείδωτο ατσάλι, γυαλί) της επιφάνειας στην μεταφορά των κυττάρων του παθογόνου *Salmonella* από τα εμβολιασμένα τροφικά υπολείμματα στα τρόφιμα που ήρθαν σε άμεση επαφή για 1 λεπτό (Γραφήματα 3.3, 3.4 και 3.5). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί διότι τα υπολείμματα των τροφίμων γίνονται η νέα επιφάνεια επαφής με τους μικροοργανισμούς και δεν ισχύουν οι διαφορές μεταξύ των αδρανών επιφανειών (Bernbom *et al.*, 2006).

Η υδροφοβικότητα των επιφανειών έχει αποδειχτεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο κατά την μεταφορά βακτηρίων από τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα (Chung, Dickson & Crouse 1989; Dickson & Koohmaraie 1989; Foong & Dickson 2004; Sattar *et al.*, 2001). Στις πιο υδροφοβικές επιφάνειες έχει παρατηρηθεί μειωμένη προσκόλληση (Dickinson *et al.*, 1997; van Loosdrecht *et al.*, 1987). Το πλαστικό έχει περιγραφεί σαν αρκετά υδροφοβικό, όπως και το ανοξείδωτο ατσάλι αλλά σε μικρότερη κλίμακα (Lafuma and Quere, 2003). Ενώ το γυαλί είναι υδροφιλικό. Σε έρευνα των Abban, Jakobsen και Jespersen (2012) οι μετρήσεις της γωνίας επαφής του νερού, που χρησιμοποιήθηκε σαν δείκτης μέτρησης της υδροφοβικότητας έδειξαν ότι οι επιφάνειες (αλουμίνιο, πλαστικό και ανοξείδωτο ατσάλι) χωρίς τροφικά υπολείμματα διέφεραν μεταξύ τους ως προς την υδροφοβικότητα. Όμως η παρουσία των τροφικών υπολειμμάτων (υπολείμματα από κοτόπουλο) προκάλεσε σημαντική μείωση στις μετρήσεις της γωνίας επαφής του νερού, δηλαδή της υδροφοβικότητας και για τα τρία υλικά των επιφανειών σε σύγκριση με τις αντίστοιχες επιφάνειες χωρίς υπολείμματα. Αυτό έχει παρατηρηθεί και για άλλα τροφικά υπολείμματα (μοσχάρι, χοιρινό, μπακαλιάρο, σολομό, μύδια και πέστροφα) σε ανοξείδωτο χάλυβα (Bemborn *et al.*, 2009). Στην πραγματικότητα, τα στοιχεία δείχνουν ότι οι επιφάνειες με διαφορετικές αρχικές ιδιότητες γίνονται παρόμοιες (υδρόφιλες) όταν καλύπτονται με τροφικά υπολείμματα (Midelet & Carpentier, 2002).

3.3.3 Επίδραση από την προσθήκη ή όχι απορρυπαντικού

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του απορρυπαντικού (υγρό πιάτων) στην μεταφορά των βακτηρίων από τις επιφάνειες με τα υπολείμματα προς τα τρόφιμα, η παρουσία του απορρυπαντικού στα τροφικά υπολείμματα κατά την επώαση στην 24ωρη συντήρηση τους πάνω στα κουπόνια στους 25° C προκάλεσε την μείωση του ποσοστού μεταφοράς των κυττάρων *Salmonella*, κυρίως στο μάρτυρα (MRD) και λιγότερο στα τροφικά υπολείμματα από βόειο κιμά (BK) (Γραφήματα 3.3, 3.4 και 3.5). Αυτά τα αποτελέσματα σχετικά με την προσθήκη του απορρυπαντικού είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα της ανάκτησης των κυττάρων του παθογόνου με

την μέθοδο swab με χρήση βαμβακοφόρων στυλεών (βλ. Κεφάλαιο 3.2) από τις επιφάνειες των κουπονιών.

3.3.4 Επίδραση από το είδος των τροφικών υπολειμμάτων

Το είδος των τροφικών υπολειμμάτων φάνηκε ότι επηρέασε την μεταφορά του παθογόνου στα 3 τρόφιμα κατά την άμεση επαφή τους με τις επιφάνειες. Μεγαλύτερη μεταφορά σημείωσαν τα τροφικά υπολείμματα BK (3.7-5.9 log CFU/g) και ο μάρτυρας χωρίς απορρυπαντικό σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τροφικά υπολείμματα (<0.5-3.6 log CFU/g). Ακολούθησαν το μείγμα από υπολείμματα βόειου κιμά, μαρουλιού και μαγιονέζας (mix) και τέλος το μείγμα από υπολείμματα BK και M (Γραφήματα 3.3, 3.4 και 3.5). Η διαφορά που παρατηρήθηκε στην μεταφορά του μάρτυρα MRD λόγω της επίδρασης του απορρυπαντικού, όπως προαναφέρθηκε κατά την ανάκτηση, οφείλεται στην μη παρουσία υπολειμμάτων διότι αυτά δρουν προστατευτικά κατά της επίδρασης των απορρυπαντικών.

Αυτό το γεγονός μπορεί να εξηγηθεί από την επιβίωση που παρουσιάζουν τα διάφορα τροφικά υπολείμματα κατά την ξήρανση στον αέρα πάνω στις επιφάνειες των κουπονιών. Οι Takahashi *et al.*, (2011) απέδειξαν ότι η επιβίωση του παθογόνων βακτηρίων κατά την ξήρανση στον αέρα σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα επηρεαζόταν έντονα από το είδος των τροφικών υπολειμμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Για τον παθογόνο μικροοργανισμό *S.Typhimurium*, κατά την 30ημερη περίοδο ξήρανσης στον αέρα, ο ρυθμός επιβίωσης στον τεμαχισμένο τόνο ή τον χοιρινό κιμά ήταν υψηλότερος στα κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα σε σύγκριση με αυτά που είχαν υπολείμματα από τεμαχισμένο λάχανο και τα κουπόνια χωρίς υπολείμματα τροφίμων. Την πρώτη μέρα παραμονής στον αέρα για την ξήρανση τους, τα κουπόνια με τα υπολείμματα από χοιρινό κιμά παρουσίασαν μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου *Salmonella* μόνο κατά 0,8 λογάριθμους ενώ για το λάχανο 2 λογάριθμους. Επίσης στο λάχανο η επιβίωση του μηδενίστηκε την 14^η μέρα ενώ για τον χοιρινό κιμά επιβίωσε και τις 30 ημέρες ξήρανσης.

Δυο ακόμα παράγοντες που συνέβαλλαν στην μειωμένη μεταφορά που παρατηρήθηκε από τα υπολείμματα που περιείχαν λαχανικά προς τα τρόφιμα μπορεί

να εξηγηθεί από την παρουσία φαινολικών ουσιών στα λαχανικά και τον ανταγωνισμό μεταξύ της μικροχλωρίδας του λαχανικού και του εμβολιασμένου παθογόνου *Salmonella*. Οι Delaquis, Wen, Toivonen, και Stanich (2006) ανέφεραν την παρουσία ουσιών, πιθανόν φαινολικής φύσεως που προέκυψαν κατά τον τεμαχισμό μαρουλιού και προκάλεσαν την αναστολή του *L. monocytogenes*. Η πιθανή παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών στα εκχυλίσματα λάχανου με την θανάτωση του *S. Typhimurium* έχει επίσης επιβεβαιωθεί από τους Manios *et al.*, (2012). Σχετικά με τον δεύτερο παράγοντα η ανασταλτική επίδραση της χλωρίδας του λαχανικού κατά των παθογόνων παραγόντων μπορεί να αποδοθεί στον ανταγωνισμό για τις διαθέσιμες θρεπτικές ουσίες, στην παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (όπως γαλακτικό οξύ, βακτηριοσίνες) και / ή στην τροποποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων (pH, οξειδοαναγωγικό δυναμικό) του μικρο-περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται τα παθογόνα (Al-Zeyara, Javris, & Mackey, 2011; Huis in't Veld, 1996; Jay, Loessner, & Golden, 2005).

Η επίδραση των δυο παραγόντων φαίνεται να ενισχύεται κατά την μεταφορά του μείγματος από υπολείμματα BK, M και ΜΓ (mix) και περισσότερο για το μείγμα από υπολείμματα BK και M. Εκτός από την παρουσία των φαινολικών ουσιών του λαχανικού με αντιμικροβιακή δράση, έχουμε έντονα αυξημένο ανταγωνισμό λόγω της επιπλέον προσθήκης της αλλοιογόνου χλωρίδας του κρέατος με τις αρνητικές συνέπειες για την επιβίωση του εμβολιασμένου παθογόνου. Αυτό έχει σαν αντίκτυπο την μικρότερη μεταφορά στα τρόφιμα από αυτές τις δυο περιπτώσεις. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην ανάκτηση με την μέθοδο swab για αυτές τις τρεις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν τελευταία.

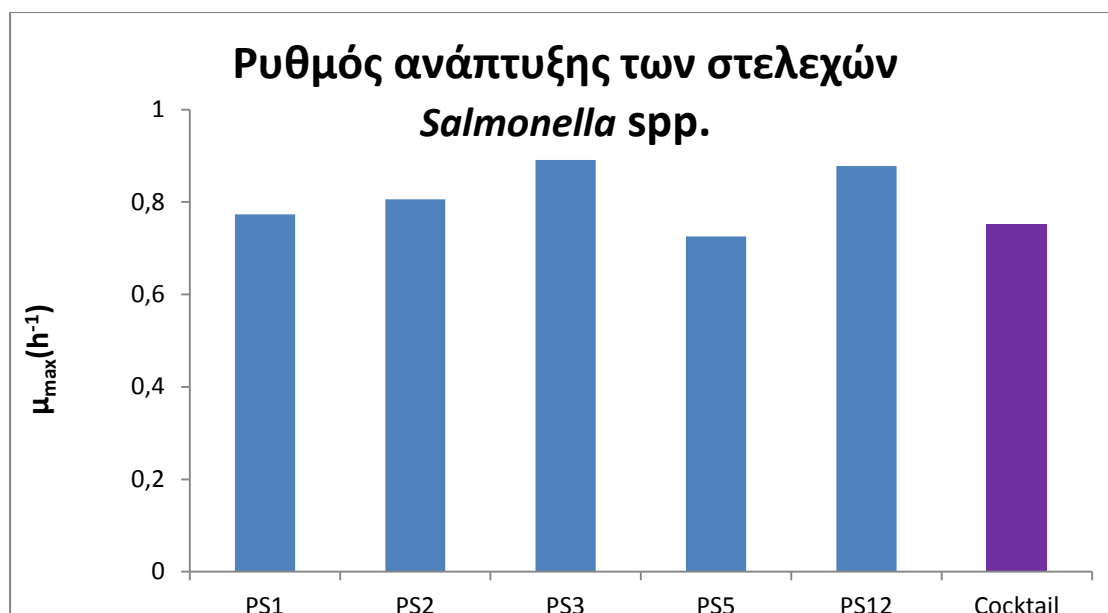
Η πληθώρα των παραγόντων που επηρεάζουν την επιβίωση και την προσκόλληση και επομένως την ανάκτηση και την μεταφορά των κυττάρων του εμβολιασμένου παθογόνου *Salmonella* στις δυο τελευταίες περιπτώσεις (υπολείμματα από: α) BK + M, β) Mix) είχε σαν αποτέλεσμα την μεγάλη παραλλακτικότητα των αποτελεσμάτων. Τόσο στην ανάκτηση όπου οι τυπικές αποκλίσεις ήταν εμφανώς μεγαλύτερες σε αυτές τις περιπτώσεις, όσο και στην μεταφορά στα τρόφιμα όπου παρατηρήθηκαν διαφορές με αποκλίσεις και χωρίς κοινή τάση που να αφήνει περιθώριο για ξεκάθαρη εξήγηση των αποτελεσμάτων.

3.4 Ρυθμός ανάπτυξης και χρόνος προσαρμογής του βακτηρίου *Salmonella* και η επίδραση διαφορετικών παραγόντων (παρουσία απορρυπαντικού, τροφικά υπολείμματα, είδος υλικού επιφάνειας).

Κατά την διαδικασία μέτρησης του ρυθμού ανάπτυξης και του χρόνου προσαρμογής υποβάλλαμε τα κύτταρα *Salmonella* σε καταπόνηση με την ρύθμιση του θρεπτικού διαλύματος TSB, στο οποίο επώαστηκε (25°C) ο παθογόνος μικροοργανισμός στα βοηθία των micro-plates κατά την μέτρηση με την συσκευή Bioscreen C, σε pH 5.5 και NaCl 2 % w/v. Η καταπόνηση εφαρμόστηκε, πρώτον για να προσομοιώσουμε τις συνθήκες ενός τροφίμου και δεύτερον, για να γίνουν οι συνθήκες πιο δυσμενείς για τον παθογόνο και να παρατηρήσουμε τις διαφορές στον χρόνο που χρειάζεται για να προσαρμοστεί (χρόνος προσαρμογής) έτσι ώστε να αρχίσει να πολλαπλασιάζεται (φάση εκθετικής ανάπτυξης) ανάλογα με τους παράγοντες που ενδεχομένως επηρεάζουν τους παραμέτρους κινητικής ανάπτυξης του.

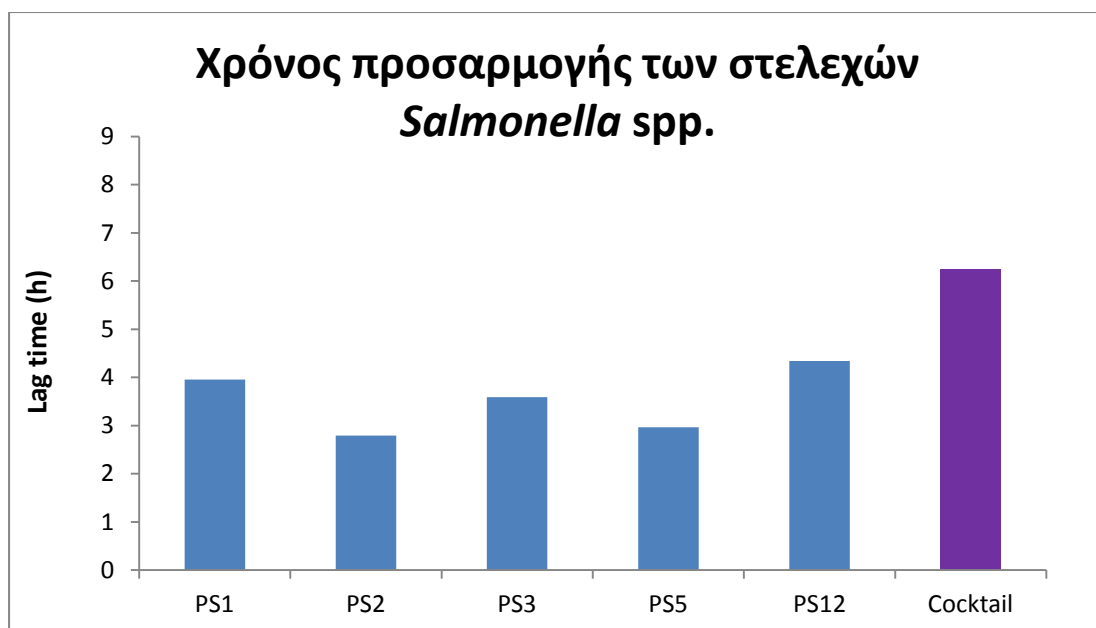
3.4.1 Ρυθμός ανάπτυξης και χρόνος προσαρμογής για τα 5 μελετηθέντα στελέχη *Salmonella* spp.

Τα 5 διαφορετικά στελέχη του παθογόνου *Salmonella* spp., είτε ξεχωριστά είτε σε μείγμα (cocktail), υποβλήθηκαν σε μέτρηση του χρόνου προσαρμογής (lag time) και του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) στην συσκευή Bioscreen C, χωρίς να έχουν καταπονηθεί με την επώαση πάνω στις επιφάνειες για 24 ώρες, με τις ίδιες συνθήκες καταπόνησης (pH 5.5, NaCl 2 %) που υποβλήθηκαν σαν μείγμα (cocktail 5 strains) στις υπόλοιπες πειραματικές διαδικασίες. Λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση της διαφορετικότητας των στελεχών του παθογόνου στον ρυθμό ανάπτυξης και τον χρόνο προσαρμογής, ειδικότερα υπό συνθήκες καταπόνησης (Lianou *et al.*, 2011; Fehlhaber and Krüger, 1998), έπρεπε να μετρηθούν οι σχετικοί παράμετροι κινητικής των 5 στελεχών ξεχωριστά για να εξαλειφθούν οι αμφιβολίες για την επίδραση αυτού του παράγοντα στην υπόλοιπη πειραματική διαδικασία.



Γράφημα 3.6: Ο ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max}) για τα 5 διαφορετικά στελέχη, είτε ξεχωριστά είτε σε μείγμα (mix), του παθογόνου *Salmonella* spp. που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη ύστερα από την επώαση στην συσκευή Bioscreen C σε συνθήκες καταπόνησης (pH 5.5, NaCl 2%).

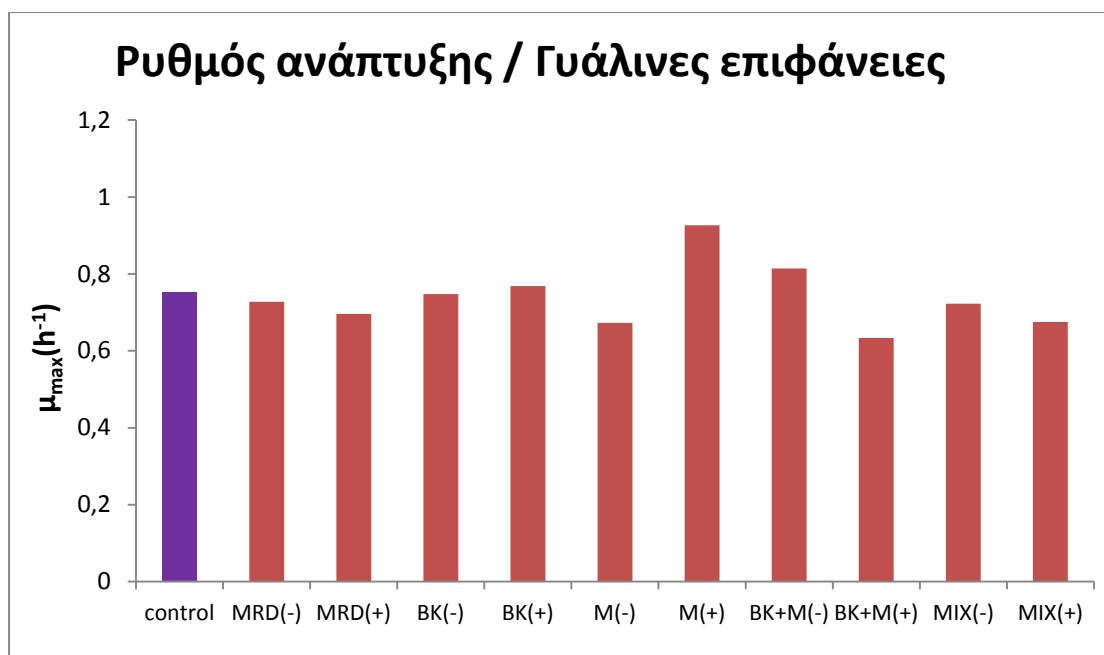
Τα 5 στελέχη *Salmonella* spp. ξεχωριστά και το μείγμα τους (cocktail), δεν παρουσίασαν μεταξύ τους σημαντικές διαφορές στον ρυθμό ανάπτυξης (Γράφημα 3.6), ο οποίος κυμαίνεται από 0.73 έως 0.89 h^{-1} . Αντίθετα, παρατηρήθηκε διαφορά στον χρόνο προσαρμογής μεταξύ των στελεχών όταν μελετήθηκαν ξεχωριστά (2.79-4.34 hours) και όταν επώαστηκαν μαζί σε μείγμα (cocktail) με τα 5 στελέχη (6.23 hours) (Γράφημα 3.7). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των στελεχών για τα θρεπτικά συστατικά, γεγονός που καταπόνησε τα κύτταρα με αποτέλεσμα να αυξηθεί ο χρόνος προσαρμογής τους σε σύγκριση με όταν επώαστηκε κάθε στέλεχος ξεχωριστά. Συμπεραίνεται ότι η διαφορετικότητα των στελεχών του παθογόνου δεν είναι στατιστικά σημαντική για να επηρεάζει τα μετέπειτα αποτελέσματα στις μετρήσεις των παραμέτρων κινητικής, όταν αυτό ενοφθαλμιστεί για επώαση στα τροφικά υπολείμματα και ύστερα πάνω στις επιφάνειες.



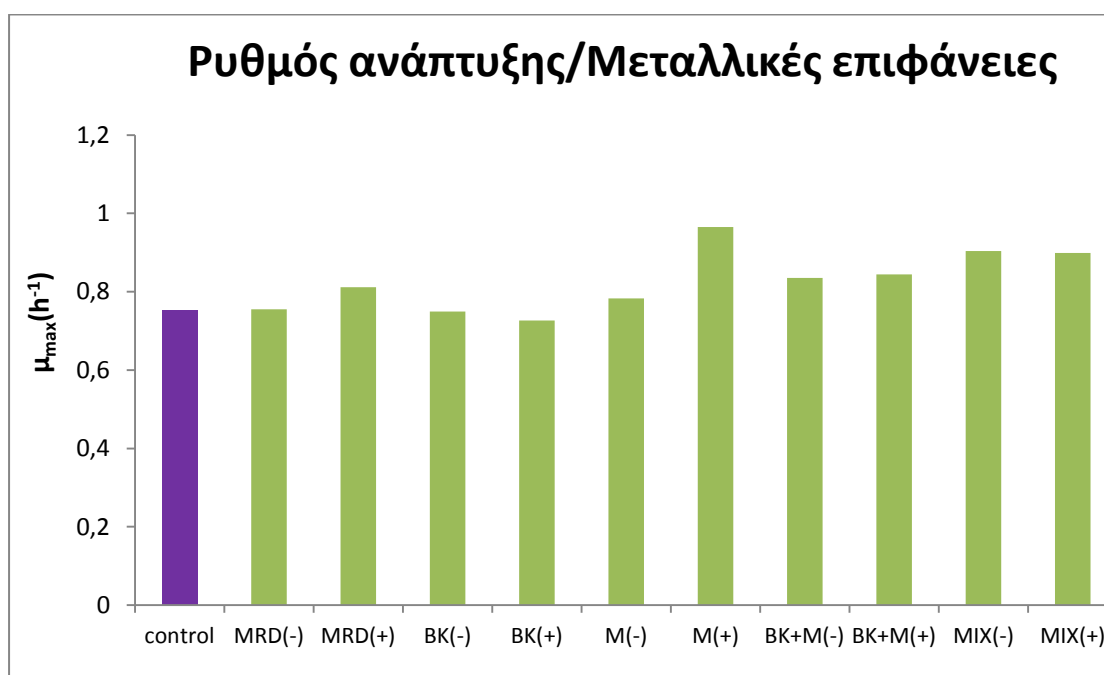
Γράφημα 3.7: Ο χρόνος προσαρμογής (lag time) για τα 5 διαφορετικά στελέχη, είτε ξεχωριστά είτε σε μείγμα (mix), του παθογόνου *Salmonella* spp. που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη ύστερα από την επώαση στην συσκευή Bioscreen C σε συνθήκες καταπόνησης (pH 5.5, NaCl 2%).

3.4.2 Ρυθμός ανάπτυξης

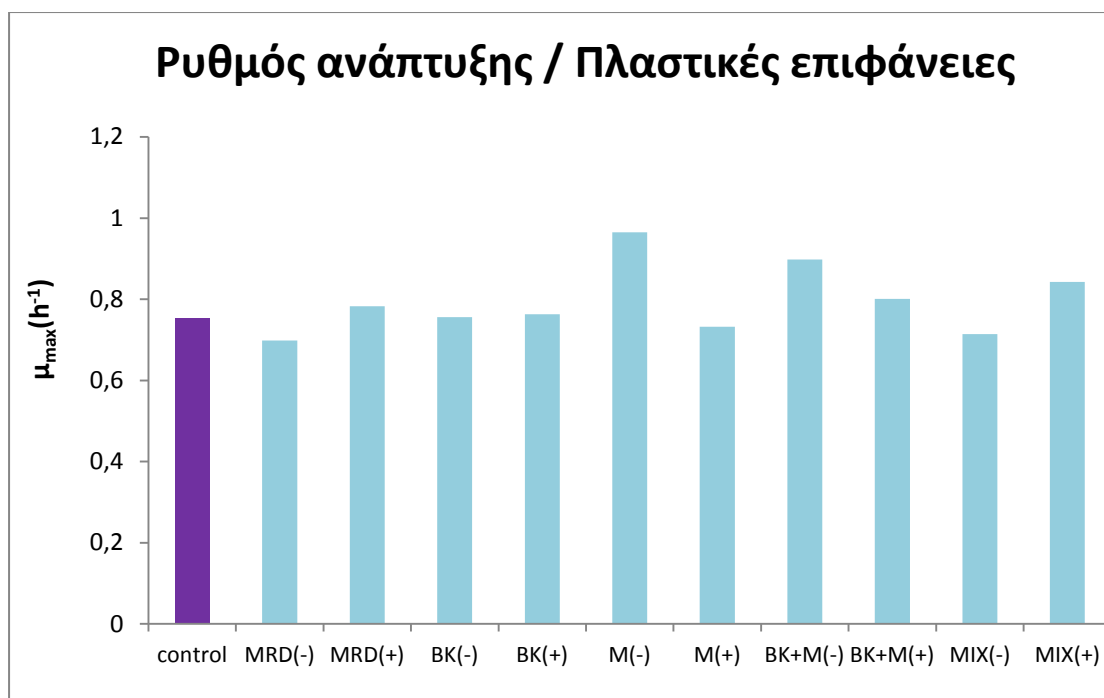
Σε αυτό το στάδιο εξετάστηκε η επίδραση των τριών παραγόντων (τροφικά υπολείμματα, υλικό επιφάνειας και παρουσία απορρυπαντικού) στον μέγιστο ειδικό αριθμό αύξησης (μ_{max}) του παθογόνου *Salmonella* spp. κατά την επώαση στην συσκευή Bioscreen C στους 25°C σε συνθήκες stress (pH 5.5, NaCl 2 % w/v), οι οποίες μπορούν να προσομοιάσουν τις συνθήκες αλατότητας και οξύτητας ενός τροφίμου. Όσον αφορά την επίδραση των τροφικών υπολειμμάτων και του υλικού της επιφάνειας, φάνηκε ότι δεν επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης σημαντικά (Γράφημα 3.8, 3.9, 3.10). Ο τρίτος παράγοντας, η παρουσία του απορρυπαντικού (κοινό υγρό πιάτων), παρομοίως δεν έχει επίδραση στον ρυθμό ανάπτυξης του παθογόνου. Επίσης, η επώαση του βακτηρίου πάνω στις επιφάνειες, με όλες τις καταπονήσεις που αυτό συνεπάγεται, δεν επηρέασαν τον ρυθμό ανάπτυξης, διότι κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα με τον ρυθμό ανάπτυξης όταν ο παθογόνος επώαστηκε κατευθείαν στο θρεπτικό διάλυμα TSB χωρίς την προηγούμενη παραμονή του πάνω στις επιφάνειες για 24 ώρες.



Γράφημα 3.8: Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού *Salmonella* ύστερα από ενοφθαλμισμό σε 4 είδη υπολειμμάτων και τον μάρτυρα MRD, με (+) και χωρίς (-) προσθήκη απορρυπαντικού στις γυάλινες επιφάνειες, σε συνθήκες καταπόνησης (pH 5.5, NaCl 2%). Ως control αναφέρεται το μείγμα των 5 στελεχών *Salmonella* spp., το οποίο δεν επώαστηκε στις επιφάνειες όπως οι υπόλοιπες περιπτώσεις.



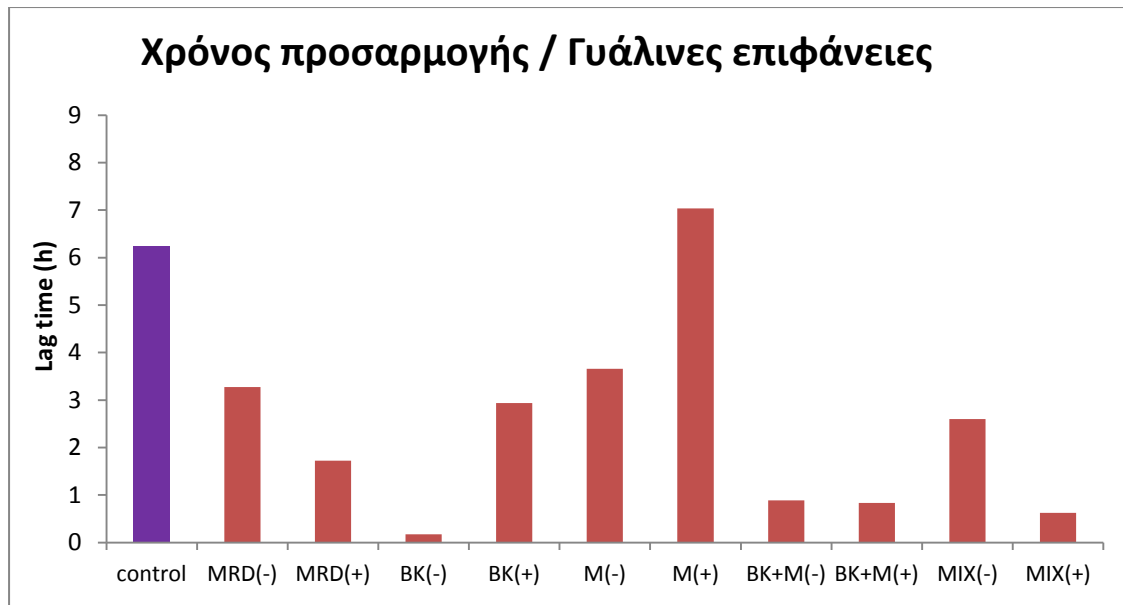
Γράφημα 3.9: Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού *Salmonella* ύστερα από ενοφθαλμισμό σε 4 είδη υπολειμμάτων και τον μάρτυρα MRD, με (+) και χωρίς (-) προσθήκη απορρυπαντικού στις μεταλλικές επιφάνειες, σε συνθήκες καταπόνησης (pH 5.5, NaCl 2%). Ως control αναφέρεται το μείγμα των 5 στελεχών *Salmonella* spp., το οποίο δεν επώαστηκε στις επιφάνειες όπως οι υπόλοιπες περιπτώσεις.



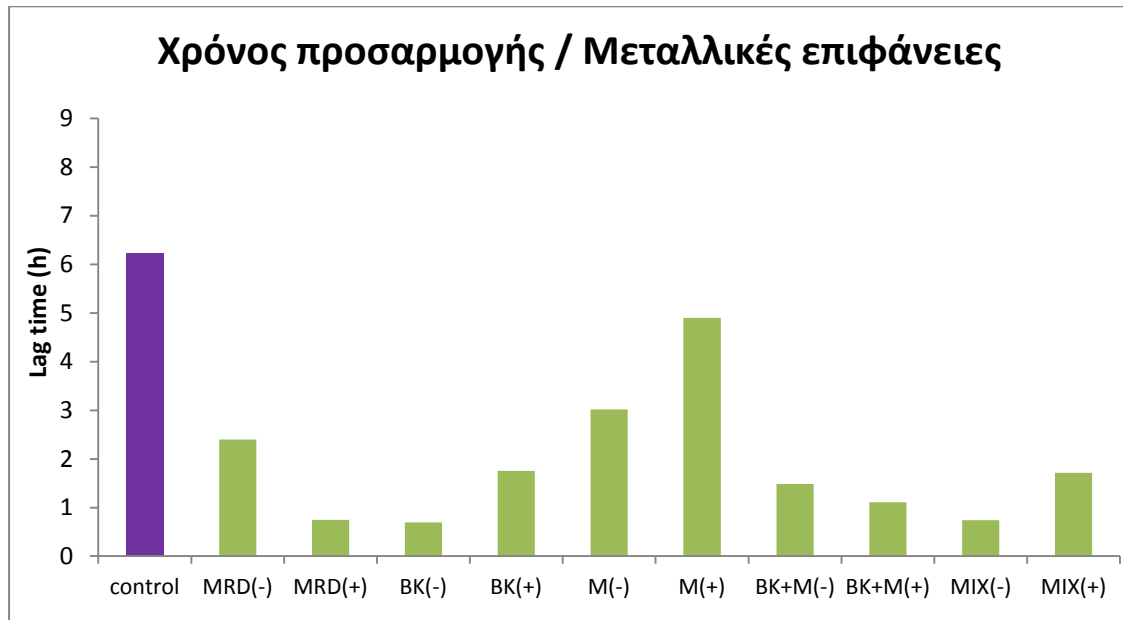
Γράφημα 3.10: Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού *Salmonella* ύστερα από ενοφθαλμισμό σε 4 είδη υπολειμμάτων και τον μάρτυρα MRD, με (+) και χωρίς (-) προσθήκη απορρυπαντικού σε 3 διαφορετικά υλικά επιφανειών, σε συνθήκες καταπόνησης (pH 5.5, NaCl 2%). Ως control αναφέρεται το μείγμα των 5 στελεχών *Salmonella* spp., το οποίο δεν επωάστηκε στις επιφάνειες όπως οι υπόλοιπες περιπτώσεις.

3.4.3 Χρόνος προσαρμογής

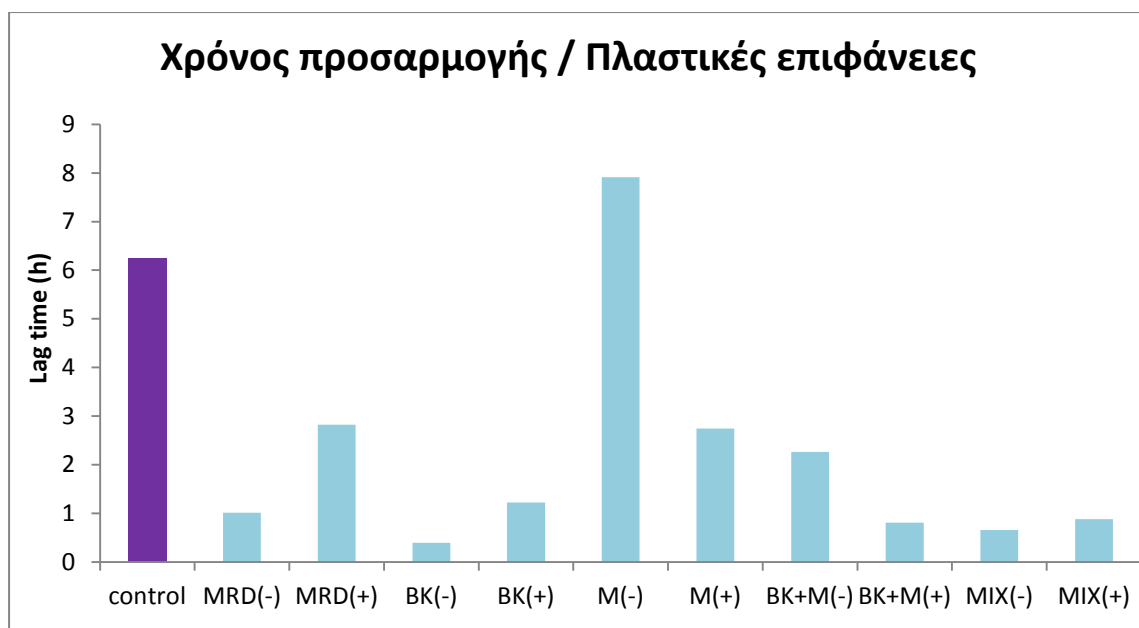
Ύστερα αξιολογήθηκε η επίδραση των τριών παραγόντων που εξετάσαμε στην παρούσα μελέτη (τροφικά υπολείμματα, υλικό επιφάνειας και παρουσία απορρυπαντικού) στον χρόνο προσαρμογής του παθογόνου *Salmonella* spp. κατά την επώαση στην συσκευή Bioscreen C στους 25°C σε συνθήκες stress. Όσον αφορά την επίδραση του υλικού της επιφάνειας, φάνηκε ότι δεν επηρεάζει τον χρόνο προσαρμογής (Γράφημα 3.11, 3.12, 3.13).



Γράφημα 3.11: Χρόνος προσαρμογής του πληθυσμού *Salmonella* ύστερα από ενοφθαλμισμό σε 4 είδη υπολειμμάτων και τον μάρτυρα MRD, με (+) και χωρίς (-) προσθήκη απορρυπαντικού σε 3 διαφορετικά υλικά επιφανειών, σε συνθήκες καταπόνησης (pH 5.5, NaCl 2%). Ως control αναφέρεται το μείγμα των 5 στελεχών *Salmonella* spp., το οποίο δεν επωάστηκε στις επιφάνειες όπως οι υπόλοιπες περιπτώσεις.



Γράφημα 3.12: Χρόνος προσαρμογής του πληθυσμού *Salmonella* ύστερα από ενοφθαλμισμό σε 4 είδη υπολειμμάτων και τον μάρτυρα MRD, με (+) και χωρίς (-) προσθήκη απορρυπαντικού σε 3 διαφορετικά υλικά επιφανειών, σε συνθήκες καταπόνησης (pH 5.5, NaCl 2%). Ως control αναφέρεται το μείγμα των 5 στελεχών *Salmonella* spp., το οποίο δεν επωάστηκε στις επιφάνειες όπως οι υπόλοιπες περιπτώσεις.



Γράφημα 3.13: Χρόνος προσαρμογής του πληθυσμού *Salmonella* ύστερα από ενοφθαλμισμό σε 4 είδη υπολειμμάτων και τον μάρτυρα MRD, με (+) και χωρίς (-) προσθήκη απορρυπαντικού σε 3 διαφορετικά υλικά επιφανειών, σε συνθήκες καταπόνησης (pH 5.5, NaCl 2%). Ως control αναφέρεται το μείγμα των 5 στελεχών *Salmonella* spp., το οποίο δεν επώαστηκε στις επιφάνειες όπως οι υπόλοιπες περιπτώσεις.

Ωστόσο, γενικά η παραμονή του παθογόνου εντός των τροφικών υπολειμμάτων αλλά και στον μάρτυρα (MRD) πάνω στην επιφάνεια των κουπονιών για 24 ώρες πριν την επώαση στην συσκευή Bioscreen C με συνθήκες stress, με την προσθήκη ή όχι απορρυπαντικού, συνέβαλλε στην μείωση του χρόνου προσαρμογής του μικροοργανισμού (0.17 – 3.65 ώρες, ανάλογα με το είδος του υπολείμματος) σε σύγκριση με τον χρόνο προσαρμογής των 5 στελεχών του παθογόνου *Salmonella* spp. κατά την επώαση υπό τις ίδιες συνθήκες stress, χωρίς την προηγούμενη παραμονή τους πάνω στις διαφορετικές επιφάνειες (6.23 ώρες), λόγω της προσαρμογής στην καταπόνηση (stress adaptation). Εξάιρεση αποτελούν τα τροφικά υπολείμματα από μαρούλι (M), του οποίου ο χρόνος προσαρμογής κυμαίνεται σε ίδια επίπεδα με το control (3.02 - 7.90 ώρες).

Κάθε μικροοργανισμός έχει ένα ιδανικό εύρος θερμοκρασιών, ιδανικό εύρος οξύτητας, ενεργότητας νερού, στο οποίο αναπτύσσεται. Σε κάποιες περιπτώσεις οι συνθήκες κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού μεταβάλλονται. Ο βαθμός της αλλαγής μπορεί να είναι τόσο ισχυρός ώστε τα κύτταρα να πεθάνουν. Όταν όμως η καταπόνηση είναι ήπια, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί στρεσάρονται και πιθανόν

παρατηρείται μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης τους, όμως κατόπιν αναπτύσσουν καινούργιους μηχανισμούς προστασίας και μεταβολισμού και καταφέρνουν να επιβιώσουν στις τροποποιημένες συνθήκες. Η καταπόνηση, έτσι όπως ορίζεται στην μικροβιολογία, είναι παράγοντες ή καταστάσεις οι οποίες επηρεάζουν την μικροβιακή ανάπτυξη ή επιβίωση. Η αύξηση της αντοχής ενός οργανισμού σε διάφορους παρεμποδιστικούς παράγοντες αφού πρώτα εκτεθεί σε αυτούς κάτω από ήπιες συνθήκες, χαρακτηρίζεται ως προσαρμογή στην καταπόνηση (stress adaptation).

Έχει αναγνωριστεί ότι η προσαρμογή σε όξινες και ωσμωτικές συνθήκες προκαλεί διασταυρούμενη προστασία σε άλλες καταπονήσεις (Lou and Yousef, 1996, 1997; O'Driscoll *et al.*, 1996; Faleiro *et al.*, 2003; Koutsoumanis *et al.*, 2003). Τα βακτηριακά κύτταρα θα μπορούσαν να προσαρμοστούν ή να αποκτήσουν ανθεκτικότητα σε διαφορετικές συνθήκες με την τροποποίηση των μεταβολικών δραστηριοτήτων, είτε προσαρμόζοντας την αξιοποίηση των θρεπτικών, είτε χρησιμοποιώντας ένζυμα που προηγουμένως παρουσίαζαν ένα δευτερεύοντα ρόλο. Η προσαρμογή (pre-adaptation) στις δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης μπορεί να μειώσει δραματικά τον χρόνο προσαρμογής (Hudson, 1993; Kroll & Patchett, 1992; Buchanan & Klawitter, 1991; και Dufrenne *et al.*, 1997) και το μέγεθος αυτής της επίδρασης είναι δύσκολο να προβλεφθεί.

Όσον αφορά την περίπτωση του μαρουλιού που παρουσίασε περίπου ίσο χρόνο προσαρμογής με το control, μπορούν να γίνουν δυο υποθέσεις. Η πρώτη υπόθεση αφορά την μεταφορά, κατά την ανάκτηση, αντιμικροβιακών ουσιών και συγκεκριμένα φαινολικών ουσιών. Οι Delaquis, Wen, Toivonen, και Stanich (2006) ανέφεραν την παρουσία ουσιών, πιθανόν φαινολικής φύσεως που προέκυψαν κατά τον τεμαχισμό μαρουλιού και προκάλεσαν την αναστολή του *L. monocytogenes*. Κατά την ανάκτηση του συγκεκριμένου τροφικού υπολείμματος, κυρίως στις πλαστικές επιφάνειες, παρατηρήθηκε αποκόλληση όλης της ενοφθαλμισμένης και σχεδόν ξηραμένης κηλίδας με αποτέλεσμα να μεταφερθούν ουσίες από το προηγούμενο περιβάλλον του TY μαρουλιού στο βοθρίο του micro-plate με το TSB για την επώαση. Αυτές οι αντιμικροβιακές ουσίες, με την δημιουργία δυσμενέστερου περιβάλλοντος, μπορεί να συμβάλλουν στον αυξημένο χρόνο προσαρμογής σε σχέση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις είτε δεν υπήρχε μαρούλι (MRD, BK), είτε περιείχαν μισή ποσότητα μαρουλιού εντός των TY (BK+M, Mix), με συνέπεια να μεταφέρονται αντίστοιχα μικρότερες ποσότητες των αντιμικροβιακών

ουσιών και να μην επηρεάζεται σημαντικά ο χρόνος προσαρμογής. Η δεύτερη υπόθεση αφορά την διαθεσιμότητα σε θρεπτικά στοιχεία στην περίπτωση του ΤΥ μαρουλιού, όπου τα άμεσα αφομοιώσιμα θρεπτικά είναι περιορισμένα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ΤΥ που περιέχουν κρέας. Αυτό το γεγονός μπορεί να αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα καταπόνησης, με συνέπεια να αυξάνει τον χρόνο προσαρμογής του συγκεκριμένου τροφικού υπολείμματος.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά το πλύσιμο των σκευών με οικιακούς σπόγγους είναι γνωστό ότι μπορεί να μεταφερθούν και να επιβιώσουν παθογόνοι μικροοργανισμοί στην επιφάνεια των περιεκτών συντήρησης τροφίμων. Από τις επιφάνειες ύστερα, όπως αποδείχτηκε και από την παρούσα εργασία, μπορούν να μεταφερθούν μέσω της επαφής σε Έτοιμα Προς Κατανάλωση ή προ-μαγειρεμένα τρόφιμα. Η μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών παραγόντων (είδος τροφικών υπολειμμάτων, είδος υλικού επιφάνειας, παρουσία ή όχι απορρυπαντικού) στην μεταφορά του παθογόνου *Salmonella* spp. προς τα προ-μαγειρεμένα τρόφιμα έδειξε ότι η έκθεση του παθογόνου σε περιβάλλον χωρίς θρεπτικά συστατικά (MRD) ή σε τροφικά υπολείμματα από κρέας, χωρίς την παρουσία απορρυπαντικού, ευνόησε την μεταφορά σε σύγκριση με άλλα τροφικά υπολείμματα. Η παρουσία του απορρυπαντικού επέδρασε σημαντικά στην μείωση της μεταφοράς του παθογόνου από τον μάρτυρα (MRD) και λιγότερο στα υπόλοιπα τροφικά υπολείμματα, αποδεικνύοντας ότι η προσθήκη του απορρυπαντικού υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την μεταφορά προς τα τρόφιμα. Τα χαρακτηριστικά του τροφίμου, που εφάπτεται στις ενοφθαλμισμένες επιφάνειες, έχουν σημασία στην μεταφορά των κυττάρων του βακτηρίου. Τα λαζάνια με κόκκινη σάλτσα που διαθέτουν δυο χαρακτηριστικά μείζονος σημασίας για την μεταφορά, την υδαρότητα και την μηχανική τριβή κατά την επαφή, εμφάνισαν μεγαλύτερο ποσοστό μεταφοράς σε σύγκριση με τα άλλα δυο προ-μαγειρευμένα γεύματα (μπιφτέκια και σάλτσα ντομάτας) που διέθεταν μόνο το ένα χαρακτηριστικό από τα δύο. Τα διαφορετικά υλικά επιφάνειας που μελετήθηκαν φάνηκε ότι δεν επηρεάζουν την μεταφορά του παθογόνου στα τρόφιμα.

Όσον αφορά τον ρυθμός αύξησης του παθογόνου δεν επηρεάστηκε σημαντικά από το είδος του τροφικού υπολείμματος ή της επιφάνειας. Αντίθετα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο χρόνο προσαρμογής του παθογόνου ύστερα από την έκθεσή του σε κάποιο τροφικό υπόλειμμα ή επιφάνεια, σε σχέση με τα κύτταρα που δεν εκτέθηκαν σε τέτοιες συνθήκες, με εξαίρεση το ΤΥ μαρουλιού. Πιθανώς οφείλεται στην προσαρμογή στην προηγούμενη καταπόνηση (stress pre-adaptation) από τις δυσμενείς συνθήκες που επικρατούσαν κατά την επώαση πάνω στις επιφάνειες, με συνέπεια να παρουσιάσει μειωμένο χρόνο προσαρμογής (lag time). Μπορούμε επίσης να επισημάνουμε ότι όσο τα τροφικά υπολείμματα γίνονταν πιο σύνθετα, τόσο μεγαλύτερες τυπικές αποκλίσεις παρατηρούσαμε στα αποτελέσματα της μεταφοράς,

λόγω του πλήθους των παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν την μικροβιακή αύξηση (ποικιλομορφία της ενδογενούς χλωρίδας, παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών, διαφορετική σύσταση θρεπτικών ουσιών κ.λ.π.).

Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι είναι απαραίτητη η σωστή υγιεινή της κουζίνας και πιο συγκεκριμένα το σχολαστικό πλύσιμο και μετέπειτα επίμονο ξέπλυμα των οικιακών σκευών για να αποτραπούν φαινόμενα διασταυρούμενης επιμόλυνσης από παθογόνους μικροοργανισμούς εντός της οικίας. Από την πληθώρα των κρουσμάτων λοίμωξης που λαμβάνουν μέρος στις οικίες μπορούμε να συμπεραίνεται ότι αποτελεί μείζον πρόβλημα, το οποίο χρήζει προσοχής. Τα αποτελέσματα μπορούν να βοηθήσουν στην εκτίμηση κινδύνων που προέρχονται από μη αναμενόμενες πηγές μόλυνσης εντός του οικιακού περιβάλλοντος, π.χ. σπόγγοι, καθώς επίσης να συμβάλλουν στην ποσοτικοποίηση του κινδύνου μικροβιακής μεταφοράς από οικιακές επιφάνειες σε έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα.

Σε μελλοντικές έρευνες μπορούν να μελετηθούν οι επί μέρους παράγοντες των πολύπλοκων τροφικών υπολειμμάτων που επιδρούν στην μεταφορά και τους παραμέτρους κινητικής των μικροοργανισμών και δημιουργούν έντονες αποκλίσεις και διαφορές στα αντίστοιχα αποτελέσματα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abban S , Jakobsen M , Jespersen L. (2012). Attachment behaviour of *Escherichia coli* K12 and *Salmonella* Typhimurium P6 on food contact surfaces for food transportation . *Food Microbiology* ,31,139-147.

Absolom, D. R., Lamberti, F. V., Policova, Z., Zingg, W., van Oss, C. J., & Neumam, A. W. (1983). Surface thermodynamic of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 90-97.

Al-Zeyara, S. A., Javris, B., & Mackey, B. M. (2011). The inhibitory effect of natural microflora of food on growth of *Listeria monocytogenes* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*, 1, 98-105.

Andersen, J.B., Shuster, T.A., Hansen, K.E., Levy, A.S., & Volk, A. (2004). A camera's view of consumer food-handling behaviors. *Journal of the American Dietetic Association*, 104(2), 186-191.

Angulo, F. J., and D. L. Swerdlow. 1999. Epidemiology of human *Salmonella* enterica serovar Enteritidis infections in the United States. Pages 33–41 in *Salmonella enterica Serovar Enteritidis in Humans and Animals—Epidemiology, Pathogenesis, and Control*. A. M. Saeed, R. K. Gast, M. E. Potter, and P. G. Wall, ed. Iowa State University Press, Ames, IA.

Arumugaswamy RK, Rusul G, Abdul Hamid SN, Cheah CT. Prevalence of *Salmonella* in raw and cooked foods in Malaysia. *Food Microbiol* 1995; 12(1): 3-8

Ash I, McKendrick GD, Robertson MH, Hughes HL. Outbreak of typhoid fever connected with corned beef. *Br Med J*. 1964 Jun 6;1(5396):1474–1478.

Augustin, J.-C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V., 2000a. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4), 1706–1710.

Augustin, J.C., et Carlier, V. (2000b). Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 56 (1), 29-51.

Barker J, Naeni M, Bloomfield SF. The effects of cleaning and disinfection in reducing *Salmonella* contamination in a laboratory model kitchen. *J Appl Microbiol* 2003;95: 1351-1360.

Bernaerts, K. – Servaes, R. D. – Kooyman, S. – Versyck, K. J. – Van Impe, J.F.: Optimal temperature design for estimation of the Square Root model parameters: parameter accuracy and model validity restrictions, *Int. Jour. Of Food Microbiology*, Volume 73, 2002, pp. 145 157.

- Bernbom, N., Jørgensen, R.L., Ng, Y.Y., Meyer, R.L., Kingshott, P., Vejborg, R.M., Klemm, P., Besenbacher, F., (2006). Bacterial adhesion to stainless steel is reduced by aqueous fish extract coatings. *Biofilms* 3, 25–36.
- Beumer, R.R., te Giffel, M.C., Spoorenberg, E., Rombouts, F.M., 1996. *Listeria* species in domestic environments. *Epidemiology and Infection* 117, 437–442.
- Beumer, R., Bloomfield, S., Exner, M., Fara, G.M., Scott, E., 1999. The need for a home hygiene policy and guidelines on home hygiene. *Annali di Igiene* 11, 11–26.
- Beumer, R., Bloomfield, S., Exner, M., Fara, G.M., Scott, E., 1998. In: Gorman, R., Bloomfield, S., Adley, C. (Eds.), *A Study of Cross Contamination of Food-borne Pathogens in the Domestic Kitchen in the Republic of Ireland*. . *International Journal of Food Microbiology*, vol. 76. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 143–150.
- Beumer, R. R., & Kusumaningrum, H. D. (2003). Kitchen hygiene in daily life. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 299–302.
- Bhunia, A. K. 2008. *Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis*. United States of America: Springer Science + Business Media, LLC.
- Blom, A. W., Gozzard, C., Heal, J., Bowker, & Estela, C. M. (2002). Bacterial strike-through of re-usable surgical drapes: the effect of different wetting agents. *Journal of Hospital Infection*, 52, 52-55.
- Bloomfield, S. F. (2003). Home hygiene: a risk approach. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206, 1-8.
- de Boer, E., Hahné, M., 1990. Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. *Journal of Food Protection* 53, 1067–1068.
- Bordini, M. E. B., Asturiano Ristori, C., Jakabi, M. and Gelli, D. S. 2007. Incidence, internalization and behavior of *Salmonella* in mangoes, var. Tommy Atkins. *Food Control* 18(8): 1002-1007. doi:10.1016/j.foodcont.2006.06.003.
- Bouchrif, B., Paglietti, B., Murgia, M., Piana, A., Cohen, N., Ennaji, M., Rubino, S. and Timinouni, M., (2009). Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco. *Journal of Infection in Developing Countries* 28(3): 35-40.
- Bower, C. K., McGuire, J., & Daeschel, M. A. (1996). The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 152-156.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Van Immerseel, F., Ducatelle, R. and Pasmans, F. 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology* 130(1-2): 1-19. doi:10.1016/j.vetmic.2007.12.017.

Bradford, M.A., Humphrey, T.J., Lappin-Scott, H.M. (1997) The cross-contamination and survival of *Salmonella* enteritidis PT4 on sterile and non-sterile foodstuffs. *Letters in Applied Microbiology* 24, 261-264.

Brinkman, E., Dijk, R., Nieuwland van, L., Beumer, R.R., 1999. Microbiological quality of leftovers of foods from domestic environments and effect of chilled storage. In: Tuijtelaars, A.C.J., Samson, R.A., Rombouts, F.M., Notermans, S. (Eds.), *Food Microbiology and Food Safety into the Next Millennium*. Zeist, The Netherlands, pp. 11–12.

Brinkman, S., Gialamas, A., Jones, L., Edwards, P., and Maynard, E. (1999). Child activity patterns for environmental exposure assessment in the home. In *National Environmental Health Forum Monographs*.

Bryan, F.L., 1988. Risk of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. *Journal of Food Protection* 51, 663–673.

Brown, A. 2000. *Understanding food: principles and preparation*. Belmont, CA. Wadsworth-Thompson Learning.

Buchanan, R. L.; Cygnarowicz, M. L. A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiology*, v. 7, p. 237-240, 1990.

Buchanan, R.L. and L.A. Klawitter, 1991. Effect of temperature history on the growth of *L. monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 12: 235-246.

Byrd-Bredbenner, C., Maurer, J., Wheatley, V., Cottone, E., & Clancy, M. (2007b). Food safety hazards lurk in the kitchens of young adults. *Journal of Food Protection*, 70(4), 991-996.

Carrasco, E., A. Morales-Rueda and R.M. Garcia- Gimeno, 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. 45: 545-556.

Casadei, M.A., Cole, M.B., McClure, P., 1995. Influence of temperature fluctuations on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *Medical Microbiology Letters* 4, 382– 390.

Chen, Y., Jackson, K. M., Chea, F. P., & Schaffner, D. W. (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection*, 64, 72-80.

Cheroutre-Vialette, M., Lebert, A., 2002. Application of recurrent neural network to predict bacterial growth in dynamic conditions. *International Journal of Food Microbiology* 73, 107– 118.

Chia, T. W. R., Goulter, R. M., McMeekin, T., Dykes, G. A., & Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26, 853–859.

Chung, K. T., Dickson, J. S., & Crouse, J. D. (1989). Attachment and proliferation of bacteria on meat. *Journal of Food Protection*, 52, 173-177.

Cogan, T.A., Bloomfield, S.F. and Humphrey, T.J. (1999) The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Letters in Applied Microbiology* 29, 354–358.

Cogan and Humphrey, (2003) T.A. Cogan, T.J. Humphrey The rise and fall of *Salmonella* enteritidis in the UK *Journal of Applied Microbiology*, 94 (2003), pp. 114S–119S.

Cox, N.A., N.J. Stern, J.L. Wilson, M.T. Musgrove, R.J. Buhr and K.L. Hiatt, 2002. Isolation of *Campylobacter* spp. from semen samples of commercial broiler breeder roosters. *Avian Dis.*, 46: 717-720.

Cox, J. M. and Pavic, A. 2010. Advances in enteropathogen control in poultry production. *Journal of Applied Microbiology* 108: 745-755.

Dalton, J.C., A. Ahmadzadeh, B. Shafii, W.J. Price, and J.M. DeJarnette. 2004. Effect of thawing multiple 0.5-mL semen straws and sequential insemination number on conception rates in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 87:972-975.

Dawson, P., Han, I., Cox, M., Black, C., & Simmons, L. (2007). Residence time and food contact time effects on transfer of *Salmonella* Typhimurium from tile, wood and carpet: testing the five-second rule. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 945-953.

De Wit, J.C., Broekhuizen, G., Kampelmacher, E.H., 1979. Cross contamination during the preparation of frozen chickens in the kitchen. *Journal of Hygiene* 83, 27–32.

Delaquis, P, Wen, A, Toivonen, P and Stanich, K . 2005. Evidence of an antilisterial factor induced by wounding of iceberg lettuce tissues. *Letters in Applied Microbiology*. 42:289-295.

Dickinson, R. B., Nagel, J. A., Proctor, R. A., Cooper, S. L., 1997. Quantitative comparison of shear-dependent *Staphylococcus aureus* adhesion to three polyurethane ionomer analogs with distinct surface properties. *Journal of Biomedical Materials Research* 36, 152–162.

Dickson, J. S., & Koochmaraie, M. (1989). Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 832-836.

Dickson, J. S. (1990). Transfer of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* typhimurium between beef tissue surfaces. *Journal of Food Protection*, 53, 51-55.

Du Toit L. and V. Irma. 2005. Food practices associated with increased risk of bacterial foodborne disease of female students in self-catering residences at the Cape Peninsula University of Technology. *J. of Family Ecology and Consumer Sciences*, 33: 73–88.

Dufrenne, J., Delfgou, E., Ritmeester, W., Notermans, S., 1997. The effect of previous growth conditions on the lag phase time of some foodborne pathogenic micro-organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 89–94.

Duggan J, Phillips CA. (1998). *Listeria* in the domestic environment. *Nutrition and Food Science* 2,73-9.

Enriquez C.E., Enriquez-Gordillo R., Kennedy D.I. and Gerba C.P. (1997). Bacteriological survey of used cellulose sponges and cotton dishcloths from domestic kitchens. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 17, 2-24.

Erdogrul, O. and Erbilir, F. (2005) Microorganisms in kitchen sponges. *Internet Journal of Food Safety* V.6:17:22.

Faleiro M. L., P. W. Andrew, and D. Power. 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 84(2):207-216.

Farber JM, Hughes A. General guidelines for the safe handling of foods. *Dairy Food and Environmental Sanitation* 1995; 15: 70-78. Department of Health.

Fehlhaber, K and Kruger, G. 1998. The study of *Salmonella enteritidis* growth kinetics using rapid automated bacterial impedance technique. *J. Appl, Microbiol.* 84: 945-949.

Flint, S. H., Brooks, J. D., & Bremer, P. J. (2000). Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermoresistant streptococci. *Journal of Food Engineering*, 43, 235-242.

Finch JE, Prince J, Hawksworth M. A bacteriological survey of the domestic environment. *Journal of Applied Bacteriology* 1978 Dec;45(3):357-64.

Foong, S. C. C., & Dickson, J. S. (2004). Attachment of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. *Journal of Food Protection*, 67, 456-462.

Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2003b. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. In: Van Impe, J.F.M., Geeraerd, A.H., Legue´rinel, I., Mafart, P. (Eds.), *Predictive Modelling in Foods-Conference Proceedings*. Katholieke Universiteit Leuven/BioTeC, Belgium, pp. 200– 202. ISBN 90-5682-400-7.

Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., and Debevere, J., 2005. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes* *Int. J. Food Microbiol.*

Francois, K., Valero, A., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., Garcíá-Gimeno, R.M., Zurera, G., Devlieghere, F., 2007. Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*, cultured at refrigeration temperatures. *Food Microbiology* 24, 32–43.

- Fu, B., Taoukis, P.S., and Labuza, T.P. 1991. "Predictive Microbiology for Monitoring Spoilage of Dairy Products with Time-Temperature Integrators," *J. Food Sci.*, 56(5): 1209-1215.
- Gerba, C.P., Rose, J.B., Hass, C.N., 1996. Sensitive populations: who is at greatest risk? *International Journal of Food Microbiology* 30, 113–123.
- Gerba CP, Williams D, Sinclair RG (2010). Assessment of the potential for cross contamination of food products by reusable shopping bags. Obtained through internet: <http://uanews.org> [Accessed on 26 August, 2010].
- Giaouris, E. D., & Nychas, G. -J. E. (2006). The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air–liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*, 23, 747–752.
- Gilbert, S.E., Whyte, R., Bayne, G., Lake, R.J., van der Logt, P., 2007. Survey of internal temperatures of New Zealand domestic refrigerators. *British Food Journal* 109, 323–329.
- Gill, C. O., & Jones, T. (2002). Effects of wearing knitted or rubber gloves on the transfer of *Escherichia coli* between hands and meat. *Journal of Food Protection*, 65, 1045-1048.
- Gillespie, I.A., G.K. Adak, S.J. O'Brien, M.M. Brett and F.J. Bolton 2001. general outbreaks of infectious intestinal disease associated with fish and shellfish, England and Wales, 1992 1999. *Communicable Disease and Public Health* 4, 117-123.
- Gray, J. T. and Fedorka-Cray, P. J. 2002. *Salmonella*. In Cliver, D. O. and Riemann, H. P. (Eds.). *Foodborne diseases*, p. 55-68. San Diego: Academic Press.
- Godwin, S. and R. Coppings. 2005. Analysis of consumer food-handling practices from grocer to home including transport and storage of selected foods. *Journal of Food Distribution Research* 36(1): 55-62.
- Gorman, R., Bloomfield, S., Adley, C.C., 2002. A study of cross-contamination of foodborne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *International Journal of Food Microbiology* 76, 143–150.
- Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.C., 2005. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2940–2948.
- Guðbjörnsdóttir, B., Einarsson, H., & Thorkelsson, G. (2005). Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: influence of stainless steel surface finish and presence of gram-negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology Biotechnology*, 43, 55-61.
- Hanes, D. 2003. Nontyphoid *Salmonella*. In Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H and Vogt, P. H. (Eds.). *International handbook of foodborne pathogens*, p. 137-149. New York: Marcel Dekker, Inc.

Heal, J. S., Blom, A. W., Titcomb, D., Taylor, A., Bowker, K., & Hardy, J. R. W. (2003). Bacterial contamination of surgical gloves by water droplets spilt after scrubbing. *Journal of Hospital Infection*, 53, 136-139.

Hengge-Aronis, R. (1996). Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, pp. 1497–1512. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Hilton AC, Austin E. The kitchen dishcloth as a source of and vehicle for foodborne pathogens in a domestic setting. *International Journal of Environmental Health Research* 2000;10:257-261.

Holah, J. T., & Thorpe, R. H. (1990). Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 599–608.

Holt J. G., 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 4nd ed. Williams & Wilkins (Baltimore), 253-268 & 341-353.

Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology* 37, 145–153.

Hu, L. and Kopecko, D. J. 2003. Typhoid *Salmonella*. In Millotis, M. D. and Bier, J. W. (Eds.). *International handbook of foodborne pathogens*, p. 151-165. New York: Marcel Dekker, Inc.

Hudson, J.A., 1993. Effects of pre-incubation temperature on the lag time of *Aeromonas hydrophila*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 274–276.

Huis in't Veld, J. H. J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 1-18.

IFH (International Scientific Forum on Home Hygiene), 1998. Guidelines for prevention of infection and cross infection in the domestic environment. Intramed Communications, Milano, Italy.

Jacobsen, T., Koch, A.G., 2006. Influence of different histories of the inoculum on lag phase and growth of *Listeria monocytogenes* in meat models. *Journal of Food Protection* 69, 532–541.

Jay S, Grau FH, Smith K, Lightfoot D, Murray C, Davey GR. (1997) *Salmonella*. In: *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance*. Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology; 169-230.

Jay, L.S., Comar, D., Gavenlock, L.D., 1999a. A national Australian food safety telephone study. *Journal of Food Protection* 62, 921–928.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology* (7th ed.). New York: Springer Science + Business Media.

- Jiang X.P. and Doyle, M.P. (1999). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* enteritidis on currency. *Journal of Food Protection* 62 (2): 805-807.
- Joseph, B., Otta, S. K., & Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. On food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food*.
- Josephson K.L., Rubino J.R. and Pepper I.L. (1997). Characterization and quantification of bacterial pathogens and indicator organisms in household kitchen with and without the use of a disinfectant cleaner. *Journal of Applied Microbiology* 83 (13):737-750.
- Katz. D. A. (2000) *The science of soaps and detergents*
- Kaufmann, A. F., 1966. Pets and *Salmonella* infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 149, 1655-1661.
- Klontz KC, Timbo B, Fein S, Levy A. Prevalence of selected food consumption and preparation behaviors associated with foodborne disease. *J Food Protection* 1995; 58:927-30.
- Knabel, S.J., 1995. Foodborne illness: role of home food handling practices. *Food Technology* 49, 119-131.
- Knobben, B. A. S., Van der Mei, H. C., Van Horn, J. R., & Busscher, H. J. (2007). Transfer of bacteria between biomaterials surfaces in the operating room: an experimental study. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 80A, 790-799.
- Koutsoumanis, P.K., Kendall, P.A. and Sofos, J.N. (2003) Effect of food processing related stresses on the acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7514-7516.
- Kroll, R.G. and Patchett, R.A. (1992), Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 14: 224-227.
- Kusumaningrum H.D., Putten M.M., Rombouts F.M. Buemer R.R. (2001). Effects of Antibacterial Dishwashing Liquid on Foodborne Pathogens and Competitive Microorganisms in Kitchen Sponges. *Journal of Food Protection* 65: 61-65.
- Kusumaningrum H.D., van Putten M.M., Rombouts F.M. and Beumer R.R., (2002). Effects of antibacterial dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. *Journal of Food Protection* 65 (4): 61-65.
- Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 227-236.
- Lafuma, A., Quere, D., 2003. Superhydrophobic states. *Nature Materials* 2, 457-460.

Lake, R., Simmons, G., 2001. How important is unsafe domestic food handling in the aetiology of foodborne illness in New Zealand? New Zealand Public Health Report 8, 89–91.

Lee J, Cartwright R, Grueser T, Paskall MA. (2006) Efficiency of Manual Dishwashing Conditions on Bacterial Survival on Eating Utensils, Available online at <http://www.sciencedirect.com>.

Lianou A., Koutsoumanis K. P., (2011). Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. Food Microbiology 28, 828-837.

Line, J. E., Fain, A. R., Moran, A. B., Martin, L. M., Lechowich, R. V., Carosella, J. M., *et al.* (1991). Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-value and Z-value determinations in ground beef. Journal of Food Protection, 54, 762–766.

Lou, Y., and A. E. Yousef. 1996. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. *J. Food Prot.* 59:465–471.

Lou, Y., and A. E. Yousef. 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1252–1255.

Luber, P., Brynestad, S., Topsch, D., Scherer, K., & Bartelt, E. (2006). Quantification of *Campylobacter* species cross-contamination during handling of contaminated fresh chicken parts in kitchens. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 66-70.

Manios, S. G., Konstantinidis N., Gounadaki A. S., Skandamis P. N., (2012). Dynamics of low (1-4 cells) vs high populations of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium in fresh-cut salads and their sterile liquid or solidified extracts, Food Control doi:10.1016/j.foodcont.2012.04.023

Mackintosh, C. A., & Hoffman, P. N. (1984). An extended model for transfer of micro-organisms via the hands: differences between organisms and the effect of alcohol disinfection. *Journal of Hygiene*, 92, 345-355.

Marples, R. R., & Towers, A. G. (1979). A laboratory model for the investigation of contact transfer of micro-organisms. *Journal of Hygiene*, 82, 237-248.

Mattick, K., Durhman, K., Dominigue, G., Jorgensen, F., Sen, M., Schaffner, D. W., *et al.* (2003). The survival of foodborne pathogens during domestic washing up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces, and food. *International Journal of Food Microbiology*, 213–226.

McKellar, R.C., Lu, X., Knight, K.P., 2002a. Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 73 (2), 127– 135.

McKellar, R.C., Lu, X., Knight, K.P., 2002b. Growth pH does not affect the initial physiological state parameter (p₀) of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 73 (2), 137– 144.

McMeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T. and Ratkowsky, D.A. (1993) Predictive Microbiology. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK.

Medeiros LC, Kendall P, Hillers V, Gang C, Di Mascola S. Identification and classification of consumer food-handling behaviors for food safety education.

Mellefont, L., Neumeier, K., McMeekin, T.A., Ross, T., 2000. Induction and manipulation of bacterial lag times. In: Van Impe, J.F.M., Bernaerts, K. (Eds.), Predictive Modelling in Foods-Conference Proceedings. KULeuven/BioTeC, Belgium, pp. 70–72. ISBN 90-804818-3-1.

Mellfont, L.A., McMeekin, T.A., Ross, T., 2004. The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of physiologically distinct populations of *Salmonella typhimurium*. International Journal of Food Microbiology 92, 111–120.

Membré, J.-M., Ross, T., McMeekin, T., 1999. Behaviour of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes. Letters in Applied Microbiology 28, 216–220.

Merry, A. F., Miller, T. E., Findon, G., Webster, C. S., & Neff, S. P. W. (2001). Touch contamination levels during anesthetic procedures and their relationship to hand hygiene procedures: a clinical audit. British Journal of Anaesthesia, 87, 291-294.

Métris, A., George, S.M., Peck, M.W., Baranyi, J., 2002. Effect of sodium chloride and pH on the distribution of the lag times of individual cells of *Listeria innocua*. In: DUBY, C., CASSAR, J.P. (Eds.), Proceedings of the Seventh European Conference Food-Industry and Statistics. Lille-Cit Scientifique, Villeneuve d'Asq, France, pp. 61–66. ISBN 2-7380-1016-4.

Midelet, G., & Carpentier, B. (2002). Transfer of microorganism, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. Applied and Environmental Microbiology, 68, 4015-4024.

Midelet, G., Kobilinsky, A., & Carpentier, B. (2006). Construction and Analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria monocytogenes* from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food. Applied and Environmental Microbiology, 72, 2313-2321.

Montville, R., Chen, Y. H., & Schaffner, D. W. (2001). Glove barriers to bacterial cross contamination between hands to food. Journal of Food Protection, 64, 845-849.

Montville, R., & Schaffner, D. W. (2003). Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces. Applied and Environmental Microbiology, 69, 7188-7193.

Montville, T.J., & Matthews, K.R. (2008). Food Microbiology: An introduction, 2nd ed., ASM press, ISBN 978-1-55581-396-3, Washington, DC.

Moore, G., & Griffith, C. (2002). A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. Food Microbiology, 19, 65-73.

- Moore, C. M., Sheldon, B. W., & Jaykus, L. A. (2003). Transfer of *Salmonella* and *Campylobacter* from stainless steel to Romaine lettuce. *Journal of Food Protection*, 66, 2231-2236.
- Moore G, Blair IS, McDowell DA. *J Food Prot.* 2007 Oct;70(10):2273-80. PMID:17969608 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., *et al.* (2010). Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139(Suppl 1), S3-S15.
- Nielsen P., Brumbaugh E., Kananen L. 2002. Evaluation of the Use of Liquid Dishwashing Compounds to Control Bacteria in Kitchen Sponges. *Journal of AOAC International* 85: 107-112.
- Ochman, H., Soncini, F.C., Solomon, F., and Groisman, E.A. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7800–7804.
- O’Driscoll, B., C. G. M. Gahan, and C. Hill. 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acidtolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1693–1698.
- Oliveira, K., Oliveira, T., Teixeira, P., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2007). Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology* 38, 318-323.
- Panagiotakis A., Poimenidou S., Skandamis P. N., (2012). Effect of Detergent and Food Residues on the Survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Sponges. In International Association for Food Protection (IAFP 2012) 22-25 July, Rhode island, P1-65.
- Pascual, C., Robinson, T.P., Ocio, M.J., Aboaba, O.O., Mackey, B.M., 2001. The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. *Letters in Applied Microbiology* 33, 357– 361.
- Park, T.K., Bearson, B., Bang, S.H., Bang, I.S. and Foster, J.W. (1996) Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 20, 605–611.
- Parry, S.M., Salmon, R.L., Willshaw, G.A., Cheasty, T., 1998. Risk factors for and prevention of sporadic infections with verocytotoxin (shiga toxin) producing *Escherichia coli* O:157. *The Lancet* 351, 1019–1022.
- Parry, S.M., Miles, S., Tridente, A., Palmer, S.R., South and East Wales Infectious Disease Group. (2004). Differences in perception of risk between people who have and have not experienced *salmonella* food poisoning. *Risk Analysis* Feb;24(1), pp. 289-99.

Patrick, D. R., Findon, G., & Miller, T. E. (1997). Residual moisture determines the level of touch-contact-associated bacterial transfer following hand washing. *Epidemiology and Infection*, 119(3), 19-25.

Penteado, A. L. and Leitao, M. F. F. 2004. Growth of *Salmonella* Enteritidis in melon, watermelon and papaya pulp stored at different times and temperatures. *Food Control* 15: 369-373.

Perera, S., 2006. Annual Summary of Outbreaks in New Zealand 2005. Institute of Environmental Science and Research Ltd, Kenepuru, New Zealand.

Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R. M., & Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 130-143.

Poppe, C. (1999). Epidemiology of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. In *Salmonella* Enterica Serovar Enteritidis in Humans and Animals. *Epidemiology, Pathogenesis and Control*, pp. 3–18. Edited by A. Saeed. Ames, IA: Iowa State University Press.

Portillo, F. G. 2000. Molecular and cellular biology of *Salmonella* pathogenesis. In Cary, J. W. and Bhatnagar, D. (Eds.), *Microbial foodborne diseases: Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis*, p. 3-34). United States of America: Technomic Publishing Company, Inc.

Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Tunung, R., Jeyalecthumi, P., Noor Hidayah, M.S., Ubong, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K. and Son, R. (2011). *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal* 18 (3), 465 – 473.

Rajkowski, K., Marmer, B.S., 1995. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 at fluctuating incubation temperatures. *Journal of Food Protection* 58 (12), 1307–1313.

Ravishankar S, Zhu LB, Jaroni D. Assessing the cross contamination and transfer rates of *Salmonella* enterica from chicken to lettuce under different foodhandling scenarios. *Food Microbiol* 2010; 27:791- 4; PMID:20630321; <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.011>.

Redmond, E. C., & Griffith, C. J. (2003). Consumer food handling in the home: A review of food safety studies. *Journal of Food Protection*, 66, 130–161.

Reuter, M., Mallet, A., Bruce, M. P., & van Vliet, A. H. M. (2010). Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Applied and Environmental*.

Roberts.D. (1972) Observations on Procedures for Thawing and Spit Roasting Frozen Dressed Chickens and Post-cooking Care and Storage: with Particular Reference to Food Poisoning Bacteria. *Journal of Hygiene, Cambridge* 70, 565-588.

Roberts, D., 1982. Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970–1979. *Journal of Hygiene Cambridge* 89, 491–498.

Roberts, D. (1986) Factors contributing to outbreaks of foodborne infection and intoxication in England and Wales 1970-82. Proceedings of the 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications. Institute of Veterinary Medicine: Berlin.

Roberts, D. (1990) Sources of infection: food, *Lancet* 336:859-861.

Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M., 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 44, 83– 92.

Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Ocio, M.J., Baranyi, J. and Mackey, B.M. (2001) The effect of inoculum size on the lag phase of *L. monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 70, 163 – 173.

Rosset, R. 2001. Croissance microbienne et froid. Étude du cas particulier de *Listeria monocytogenes*. *Bulletin de l'Academie Nationale de Medicine* 185 (2):287-289.

Rusin P, Orosz-Coughlin P, Gerba C. Reduction of faecal coliform, coliform and heterotrophic plate count bacteria in the household kitchen and bathroom by disinfection with hypochlorite cleaners. *Journal of Applied Microbiology* 1998 Nov;85(5):819-28.

Rusin, P., Maxwell, S., & Gerba, C. (2002). Comparative surfacet- hand and fingertip-to-mouth transfer efficiency of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, phage. *Journal of Applied Bacteriology*, 93, 585-592.

Ryan, M.J., Wall, P.G., Gilbert, R.J., Griffin, M., Rowe, B., 1996. Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. *Communicable Disease Report CDR Review* 13, R179–182.

Sattar, S. A., Springthorpe, S., Mani, S., Gallant, M., Nair, R. C., Scott, E., *et al.* (2001). Transfer of bacteria from fabrics to hands and other fabrics: development and application of a quantitative method using *Staphylococcus aureus* as a model. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 962-970.

Schothorst M van, Huisman J, and Os M van. Search for *Salmonellae* in homes with salmonellosis in infants. *Ned Tijdschr Geneesk* 1978; 122: 1121-5.

Scott, E., Bloomfield, S.F. and Barlow, C.G. 1982. An investigation of microbial contamination in the home. *J. Hygiene*. 89: 279-293.

Scott E. and Bloomfield S.F. (1990). The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. *Journal of Applied Bacteriology* 68 (7): 271-278.

Scott, E. 1996. A review : foodborne disease and other hygienic issues in the home. *J. Applied Bacteriology*. 80: 5-9.

Scuderi, G., Fantasia, M., Filetici, E., Anastasio, M.P., 1996. Foodborne outbreaks caused by *Salmonella* in Italy, 1991–1994. *Epidemiology and Infection* 116, 257–265.

Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D. W., 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci USA 93(6):2593–2597.

Skandamis, P. N., Stopforth, J. D., Yoon, Y., Kendall, P. A., Sofos, J. N., 2007. Modeling the effect of storage atmosphere on growth - no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, sodium lactate, sodium diacetate, and NaCl. Journal of Food Protection 70, 2329-2338.

Smelt, J.P.P.M., Otten, G.D., Bos, A.P., 2002. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of *Lactobacillus plantarum*. International Journal of Food Microbiology 73, 207– 212.

Sommer, P., Martin-Rouas, C., & Mettler, E. (1999). Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. Food Microbiology, 16, 503-515.

Speirs JP, Anderton A, Anderson JG. A study of the microbial content of the domestic kitchen. International Journal of Environmental Health Research 1995;5(2):109–22.

Stamminger, R., *et al.* (2007): Washing-up Behaviour and Techniques in Europe. In: HuW 55, 1. S. 31-40.

Stekelenburg FK, Hartog BJ. Combined cleaning is restaurants' recipe for hygiene and health. Cleaning and Hygiene Today 1999;May:91-8.

Stepanovic, S., Circovik, I. C., Ranin, L., & Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology, 38(5), 428-432.

Stephens, P.J., Joynson, J.A., Davies, K.W., Holbrook, R., Lappin- Scott, H.M. and Humphrey, T.J. (1997) The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. Journal of Applied Microbiology 83, 445–455.

Takahashi H., Kuramoto S., Miya S., Kimura B. (2011). Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential foodborne pathogens on stainless steel surfaces is affected by different food soils. Food Control 22, 633-637.

Taylor, W.J. (1965): Isolation of Shigellae. I. Xylose lysine agars: new media for isolation of enteric pathogens. Am. J. Clin. Path., 44; 471-475

Terpstra MJ *et al.* (2005). Food storage and disposal: consumer practices and knowledge. British Food Journal 107(7):526-533.

Tiganitas A., Zeaki N., Gounadaki A. S., Drosinos E. H., Skandamis P. N., (2009). Study of the effect of lethal and sublethal pH and aw stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. International Journal of Food Microbiology 134, 104–112.

Tschape, H., Prager, R., Streckel, W., Fruth, A., Tietze, E., Bohme, G., 1995. Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiol. Infect.* 114, 441–450.

van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W 581., Schraa, G., Zehnder, A. J. B., (1987). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1898–1901.

Vassos D. V., 2004. *Foods & health of the consumer. Food disturbances.* 1st ed Papasotiriou (Athens), 39-68.

Vermeltfoort, P. B., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Hooymans, J. M., & Bruinsma, G. M. (2004). Physicochemical factors influencing bacterial transfer from contact lenses to surfaces with different roughness and wettability. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 7, 336-342.

Vorst, K. L., Todd, E. C., Pérez-Rodríguez, F., McMasters, R. L., & Ryser, E. T. (2004). Transfer of *Listeria monocytogenes* from a delicatessen slicer to ready-to-eat meat products. Paper presented at the IAFP's 91st Annual Meeting, Phoenix, AZ.

Vorst, K. L., Todd, E. C., & Ryser, E. T. (2006). Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, salami. *Journal of Food Protection*, 69, 619-626.

Wernersson, E. S., Johansson, E., & Hakanson, H. (2004b). Granuleassisted dishwashing improves cleanliness. *Food Service Technology*, 4, 129–137.

Whiting, R.C., Bagi, L.K., 2002. Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 73 (2– 3), 291– 295.

WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe, 7th report, 1993–1998. In: Tirado, C., Schmidt, K. (Eds.), *BGVV-FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses* (2000).

Wong, D. M. A.L. F., Hald, T., Wolf, P.J.v.d. & Swanenburg, M. (2002). Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork, *Livestock Production Science*, Vol.76, No.3, (September 2002), pp. 215-222, ISSN 0301-6226.

Worsfold, D., Griffith, C.J., 1997. Food safety behaviour in the home. *British Food Journal* 99, 97–104.

Worsfold, D., & Griffith, C. 1995. A generic model for evaluating consumer food safety behaviour. *Food Control*, 6: 357-363.

Yousef, A. E. and Carlstrom, C. 2003. *Salmonella*. In Yousef, A. E. and Carstrom, C. (Eds.). *Food microbiology: A laboratory manual*, p. 167-205. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Zwietering, M.H., Cuppers, H.G.A.M., De Wit, J.C., van't Riet, K., 1994. Evaluation of data transformations and validation of models for the effect of temperature on bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 195-203.