

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΠΜΣ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

«Ποσοτική περιγραφή της μεταφοράς παθογόνων
μικροοργανισμών μεταξύ λαχανικών και εργαλείων ή σκευών
προετοιμασίας έτοιμων-προς-κατανάλωση σαλατών»



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΤΣΟΥΡΟΥ Α. ΒΙΡΓΙΝΙΑ-ΜΑΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ, ΜΑΪΟΣ 2013

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ
**ΠΜΣ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«Ποσοτική περιγραφή της μεταφοράς παθογόνων
μικροοργανισμών μεταξύ λαχανικών και εργαλείων ή σκευών
προετοιμασίας έτοιμων-προς-κατανάλωση σαλατών»**

ΤΣΟΥΡΟΥ Α. ΒΙΡΓΙΝΙΑ-ΜΑΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ, ΜΑΪΟΣ 2013

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«Ποσοτική περιγραφή της μεταφοράς παθογόνων
μικροοργανισμών μεταξύ λαχανικών και εργαλείων ή σκευών
προετοιμασίας έτοιμων-προς-κατανάλωση σαλατών»**

ΤΣΟΥΡΟΥ Α. ΒΙΡΓΙΝΙΑ-ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Σκανδάμης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής του ΓΠΑ**
- 2) Γιαννιώτης Σταυριανός, Καθηγητής του ΓΠΑ**
- 3) Δροσινός Ελευθέριος, Αναπληρωτής Καθηγητής του ΓΠΑ**

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της συνέλευσης 456/31.10.2012 του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής Εξεταστική Επιτροπή.

*Στην οικογένεια μου
Αργύρη, Αγαθονίκη, Ανδρέα, Όλγα,
με αγάπη*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φρεσκοκομμένες σαλάτες είναι πιθανοί φορείς παθογόνων μικροοργανισμών, αφενώς λόγω πιθανής μόλυνσης των λαχανικών πριν από την συγκομιδή τους και αφετέρου λόγω πιθανής ύπαρξης διασταυρούμενης επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία τους. Ένα μοντέλο προσομοίωσης της βακτηριακής μεταφοράς μεταξύ των σκευών κοπής και των φρέσκων προϊόντων είναι μείζονος σημασίας για την ποσοτική αξιολόγηση των μικροβιακών κινδύνων σε φρεσκοκομμένες σαλάτες. Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν: i) ο καθορισμός της κατανομής του ρυθμού μεταφοράς των μικροοργανισμών *Escherichia coli* O157:H7 και *Listeria monocytogenes* μεταξύ φύλλων μαρουλιού και μαχαιριών κοπής τους, ii) η μοντελοποίηση της βακτηριακής μεταφοράς από μαχαίρια κοπής σε φρεσκοκομμένες σαλάτες, και το αντίστροφο, κατά την διαδικασία διαδοχικών κοπών πράσινων φυλλωδών λαχανικών, προσομοιάζοντας έτσι την παρεμβολή μολυσμένων παρτίδων λαχανικών κατά την προετοιμασία φρέσκων σαλατών.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη. Μίγμα τριών στελεχών του μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 και τριών του *Listeria monocytogenes* (ορότυποι 1/2a, 4b), χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει εμβολιασμός, με εμβάπτιση, φρέσκων φύλλων μαρουλιού, που προηγουμένως είχαν πλυθεί με νερό. Το μέγεθος του εμβολίου που έφεραν τα φύλλα μαρουλιού ήταν 10^5 (HI) ή 10^3 (LI) log CFU/g. Ακολούθησε προσκόλληση των κυττάρων των μικροοργανισμών (1h, 4°C). Στην συνέχεια τα φύλλα φυγοκεντρήθηκαν, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια εμβολίου. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκαν 100 μαχαίρια για να γίνουν μονές κοπές εμβολιασμένων (HI) φύλλων (ένα μαχαίρι για κάθε κοπή). Η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε σε εμβολιασμένα φύλλα μαρουλιού που είχαν μείνει στους 4°C για 4 ημέρες. Η ανάκτηση και η καταμέτρηση των μικροβιακών κυττάρων έγινε με την μέθοδο του επιχρίσματος με μπατονέτα. Το ποσοστό (%) της μεταφοράς στο μαχαίρι και το μαρούλι υπολογίστηκε ως «CFU/μαχαίρι» και «CFU/g δείγματος μαρουλιού», αντίστοιχα. Στην συνέχεια, αξιολογήθηκε η ποσοτική μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι κατά την διαδικασία διαδοχικών κοπών. Ένα στείρο μαχαίρι επιμολύνθηκε με κοπή σε μολυσμένη παρτίδα φύλλων μαρουλιού που έφερε είτε υψηλό (HI), είτε χαμηλό (LI) πληθυσμό κυττάρων. Το μαχαίρι αυτό χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιήσει 30 (HI) και 15 (LI) διαδοχικές κοπές σε ανεμβολίαστη παρτίδα μαρουλιών. Έγινε δειγματοληψία στα δείγματα μαρουλιού (10 g) που συλλέχθηκαν μετά

από κάθε κοπή καθώς και στο μαχαίρι προκειμένου να καταμετρηθεί το μικροβιακό φορτίο που έφεραν. Το μοντέλο που προτάθηκε από τους *Møller et al.* (2012), για να περιγράψει την μεταφορά (\log CFU/g) *Salmonella* Typhimurium DT104, κατά τον τεμαχισμό χοιρινού κρέατος χρησιμοποιήθηκε για να δημιουργηθεί ένα μοντέλο που θα περιγράψει την μεταφορά των *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes*, κατά την διαδικασία διαδοχικών κοπών ανεμβολίαστου μαρουλιού, με μολυσμένο μαχαίρι. Η προσαρμογή του μοντέλου αξιολογήθηκε ως εξής: μολυσμένες παρτίδες φύλλων μαρουλιού (HI ή LI), παρεμβλήθηκαν σε συγκεκριμένα σημεία της διαδικασίας των διαδοχικών κοπών, και το μοντέλο προσομοίωσε την μεταφορά των κυττάρων των δύο μικροοργανισμών τόσο στο μαχαίρι κοπής, όσο και στα δείγματα μαρουλιού. Το μοντέλο χρησιμοποιήθηκε επίσης προκειμένου να προσομοιάσει την μεταφορά των δύο μικροοργανισμών κατά την διαδικασία διαδοχικού τεμαχισμού λάχανου, με αυτόματη συσκευή τεμαχισμού λαχανικών.

Το ποσοστό της μεταφοράς του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 από μολυσμένο μαρούλι σε στείρα μαχαίρια, κατά την διαδικασία μονών κοπών κυμάνθηκε από 0,10 έως 53,01%. Για τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, το αντίστοιχο ποσοστό κυμάνθηκε από 0,20 έως 18,16 την πρώτη ημέρα εμβολιασμού και αυξήθηκε την τέταρτη ημέρα φτάνοντας έως και 79,18%. Όσον αφορά τις διαδοχικές κοπές, αρχικά παρατηρήθηκε μια ταχεία μεταφορά την οποία ακολούθησε ο σχηματισμός μιας ασυμπτωτικής στον άξονα x «ουράς» (tailing) προσδίδοντας χαμηλή μεταφορά μικροβιακού πληθυσμού στο μαρούλι. Παρά το γεγονός ότι, η ίδια εικόνα παρατηρήθηκε και στους δύο μικροοργανισμούς, τα κύτταρα του βακτηρίου *E. coli* O157:H7, μεταφέρονται βραδύτερα από του *L. monocytogenes*. Οι τάσεις αυτές περιγράφονται επαρκώς από το μοντέλο μεταφοράς, ενώ οι τιμές των RMSE είναι χαμηλές καθώς κυμαίνονται μεταξύ 0,799-0,907 και 0,426-0,613 για τον *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes*, αντίστοιχα. Το μοντέλο, επιπλέον έδειξε καλές επιδόσεις στις δοκιμές επικύρωσης με Bf 0,8-1,5 και Af 1,2-1,5. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας την αυτόματη συσκευή τεμαχισμού λαχανικών για να τεμαχιστεί λάχανο, η τάση πρόβλεψης ήταν παρόμοια, αλλά το μοντέλο υποτίμησε την μεταφορά των βακτηρίων. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην συσσώρευση μολυσμένων φυτικών υπολειμμάτων στην συσκευή.

Συμπερασματικά το μοντέλο που προτείνεται στην παρούσα μελέτη, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση του κινδύνου κατά την προετοιμασία σαλατών που αποτελούνται από πράσινα φυλλώδη λαχανικά, καθώς και την πρόβλεψη των επιπτώσεων

πιθανών σεναρίων διασταυρούμενης επιμόλυνσης, προκειμένου να εξασφαλιστούν ασφαλή τα τελικά προϊόντα.

Λέξεις Κλειδί:

Escherichia coli O157:H7

Listeria monocytogenes

Διασταυρούμενης επιμόλυνσης

Μαρούλι

Λάχανο

Μαχαίρι

Αυτόματη συσκευή τεμαχισμού λαχανικών

Μοντέλο βακτηριακής μεταφοράς

ABSTRACT

Fresh cut salads are potential vehicles of pathogens due to pre-harvest contamination, or cross-contamination during preparation. Model simulating bacterial transfer between cutting equipment and fresh produce is of high value for quantitative microbiological risk assessment of fresh cut salads. Our objectives were: i) to define the distribution of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* transfer rates between cutting knives and lettuce leaves and ii) to model the bacterial transfer from knives to fresh cut salads and *vice versa* during consecutive cuts of leafy greens, simulating preparation of fresh cut salads, also involving the sporadic introduction of contaminated leaves.

Three-strain composites of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* (serovars 1/2a, 4b) were used to dip inoculate fresh water-washed lettuce leaves with a population of 10^5 (HI) or 10^3 log CFU/g (LI). Following attachment of pathogens (1h, 4°C), the lettuce leaves were centrifuged to remove excessive inoculum. A hundred sterile knives were used to create single cuts of the inoculated (HI) leaves (one knife per cut). The same procedure was applied for inoculated lettuce leaves after 4 days at 4°C. Level of pathogens was enumerated on knives by swabbing. The % transfer to knife was determined as “cfu on knife/cfu on contaminated lettuce”. Next, the extent of transfer from knife to lettuce during consecutive cuts was evaluated. A sterile knife was contaminated by cutting inoculated lettuce leaves (bearing HI or LI levels). Subsequently, the knife was used to perform 30(HI) or 15(LI) consecutive cuts of noninoculated leaves. Leaf samples (10 g) were withdrawn during cutting for enumeration of pathogens remaining on knife or transferred to lettuce. The model suggested by Møller *et al.* (2012) to predict transfer (log CFU/g) of *Salmonella* Typhimurium DT104 during the grinding of pork was used to describe the transfer of *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* during cutting of fresh uncontaminated lettuce with contaminated knife. The model performance was evaluated as follows: contaminated batches of leaves (HI or LI) were “introduced” at specific points of the cutting process and the model simulated the transfer of the two organisms on knives and on each of the cut leaf sample. The model was also used to simulate the transfer of the two pathogens during shredding of cabbage with a household vegetable shredder (extrapolation experiments).

The transfer percentage of *E. coli* O157:H7 from contaminated lettuce to uncontaminated knives during independent cuts varied from 0.1 to 53.01%. For *L. monocytogenes*, the respective percentage ranged from 0.20 to 18.16% on the first day and increased for the 4-days stored leaves up to 79.18%. For both pathogens the distribution was left-skewed. Regarding consecutive cuts, a rapid initial transfer was followed by an asymptotic tail at low populations moving to lettuce or residing on knife. Although the same pattern was observed for the two microorganisms, *E. coli* O157:H7 was transferred at slower rates compared to *L. monocytogenes*. These trends were sufficiently described by the transfer model, showing low RMSE values of 0.799-0.907 and 0.426-0.613 for *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes*, respectively. The model also showed good performance in validation trials with *Bf* 0.8 -1.5, and *Af* 1.2-1.5. However, using the electric shredder to cut cabbage, the predicted trends were similar, but the model tended to underestimate the transfer of bacteria. This is probably associated with the accumulation of contaminated vegetable residues in the shredder.

The present model could be a useful tool for the assessment of risk during preparation of salads made of leafy greens, predicting the impact of potential cross contamination scenarios on product safety.

Key Words:

Escherichia coli O157:H7

Listeria monocytogenes

Cross-Contamination

Lettuce

Cabbage

Knife

Shredder

Transfer Model

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	8
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	12
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1 Οι μικροοργανισμοί στα τρόφιμα.....	15
1.2 Η αξία των λαχανικών στην διατροφή	16
1.3 Οι μικροοργανισμοί στα λαχανικά	17
1.4 Λαχανικά έτοιμα προς κατανάλωση	18
1.5 Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα RTU λαχανικά.....	20
1.6 Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Escherichia coli</i>	21
1.6.1 Εισαγωγή και ιστορικά δεδομένα	21
1.6.2 Ο μικροοργανισμός <i>Escherichia coli</i> και τα χαρακτηριστικά του.....	23
1.6.3 Εντεροαιμορραγικά στελέχη <i>E. coli</i> (EHEC)	25
1.6.4 Συσχετισμός με τα τρόφιμα.....	27
1.6.5 Προφυλάξεις και Έλεγχος.....	27
1.7 Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Listeria monocytogenes</i>	28
1.7.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία	28
1.7.2 Ο μικροοργανισμός <i>Listeria monocytogenes</i> και τα χαρακτηριστικά του...	28
1.7.3 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	29
1.7.4 Συσχετισμός με τα τρόφιμα.....	30
1.7.5 Προφυλάξεις και έλεγχος.....	31
1.8 Διασταυρούμενη επιμόλυνση	32
1.9 Μοντέλα Πρόβλεψης	35
ΣΚΟΠΟΣ.....	38
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
2.1 Προετοιμασία εμβολίου.....	41
A) Ανανέωση εμβολίου.....	41
B) Καθαρισμός εμβολίου	41
2.2 Προετοιμασία και εμβολιασμός των μαρουλιών	42
2.3 Προετοιμασία μαχαιριών	43
2.4 Ποσοτικοποίηση της μεταφοράς των παθογόνων μικροοργανισμών <i>L. monocytogenes</i> και <i>E. coli</i> O157:H7	44
2.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός της μεταφορά των <i>L. monocytogenes</i> και <i>E. coli</i> O157:H7 από εμβολιασμένο μαρούλι σε στείρο μαχαίρι ύστερα από μια κοπή ..	44
2.4.2 Μεταφορά των <i>L. monocytogenes</i> και <i>E. coli</i> O157:H7 από επιμολυσμένο μαχαίρι σε ανεμβολίαστο μαρούλι ύστερα από μια κοπή.....	44
2.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της μεταφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού από επιμολυσμένο μαχαίρι σε ανεμβολίαστο μαρούλι, μετά απο μία σειρά διαδοχικών κοπών.	45
2.5 Ανάπτυξη του μοντέλου.....	46

2.6 Συλλογή δεδομένων για την επικύρωση του μοντέλου	47
2.7 Μικροβιολογική Ανάλυση.....	50
2.7.1 Ποσοτικός προσδιορισμός της μικροβιακής μεταφοράς κατά τις κοπές	50
2.8 Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων.....	51
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
3.1 Ποσοτική μεταφορά των των μικροοργανισμών <i>L. monocytogenes</i> και <i>E. coli</i> O157:H7 κατά τις μονές κοπές	53
3.2 Μεταφορά των παθογόνων μικροβιακών κυττάρων από μολυσμένο μαχαίρι σε μαρούλι κατά την διαδικασία διαδοχικών κοπών	58
3.3 Προσαρμογή του μοντέλου	63
3.4 Επικύρωση του μοντέλου.....	65
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα τελευταία χρόνια, έντονη είναι η στροφή των καταναλωτών στα λαχανικά. Τα λαχανικά αποτελούν σημαντικά στοιχεία μιας υγιεινής, ισορροπημένης διατροφής καθώς μπορούν να προμηθεύσουν τον οργανισμό με βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, διαιτητικές ίνες και ενέργεια. Ωστόσο, αποτελούν ένα ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών –παθογόνων ή αλλοιογόνων. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα λαχανικά έχουν υπάρξει αιτία πολλών τροφιμογενών ασθενειών και για αυτό τον λόγο απασχολούν ιδιαίτερα την επιστημονική κοινότητα.

Δεδομένα παλαιότερων ερευνών, αναφέρουν ότι σε πολλές περιπτώσεις, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7, έχουν αποτελέσει αιτία πρόκλησης τροφιμογενών νοσημάτων, κατά την κατανάλωση έτοιμων-προς-κατανάλωση σαλατών.

Τα παραπάνω στοιχεία ήταν αρκετά, για να μας οδηγήσουν στην μελέτη της ποσοτικής μεταφοράς των μικροοργανισμών *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7, στα λαχανικά κατά την προετοιμασία τους, καθώς και την δημιουργία ενός μαθηματικού μοντέλου που θα περιγράφει αυτή την μεταφορά.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου, κύριο Σκανδάμη Παναγιώτη, αρχικά για την ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης και ύστερα για την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της. Μέσα από τη συνεργασία μας κατάφερα να διευρύνω τις γνώσεις μου στον τομέα της μικροβιολογίας τροφίμων.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κυρίους Γιαννιώτη Σταυριανό και Δροσινό Ελευθέριο για την παρουσία τους ως μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής. Επιπλέον, τον κύριο Αθανασόπουλο Παναγιώτη για τις συμβουλές του, καθόλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Παράλειψή μου μεγάλη, θα ήταν εάν δεν ευχαριστούσα, την Ζιλελίδου Ευαγγελία, υποψήφια διδάκτορα, καθώς η βοήθεια, η εμπύχωση και η συμβολή της από την αρχή μέχρι και την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης υπήρξε καθοριστική και πολύτιμη.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και την δημιουργία ενός ευχάριστου περιβάλλοντος στον

εργαστηριακό χώρο αλλά και όλους όσους συνεισέφεραν στην ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης.

Βαθεία εκτίμηση και ειλικρινείς ευχαριστίες, θα ήθελα να εκφράσω τόσο στην οικογένεια μου –τους γονείς μου Αργύρη και Αγαθονίκη και τα αδέρφια μου Ανδρέα και Όλγα, όσο και σε ακόμα έναν πολύ σημαντικό, για εμένα, άνθρωπο, για την ενθάρρυνση και τον σπουδαίο υποστηρικτικό τους ρόλο, καθ' όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Μάϊος 2013

Τσούρου Βιργινία-Μαρία

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οι μικροοργανισμοί στα τρόφιμα

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η παγκοσμιοποίηση, η αύξηση των διεθνών ταξιδιών και του εμπορίου, καθώς και οι προτιμήσεις των καταναλωτών σε όσο το δυνατόν λιγότερο επεξεργασμένα τρόφιμα, έχει οδηγήσει σε αύξηση των τροφιμογενών νοσημάτων, πολλών εκ των οποίων οδήγησαν στο θάνατο. Επιπλέον, τρόφιμα τα οποία παλαιότερα θεωρούνταν «αθώα», σταδιακά συνδέθηκαν με εξάρσεις τροφικών δηλητηριάσεων. Το γεγονός αυτό, αποτέλεσε κριτήριο, ώστε να αυξηθούν σημαντικά οι μελέτες και έρευνες που αφορούν τους παθογόνους μικροοργανισμούς, τους τοξικούς τους μεταβολίτες, καθώς και την παθογένεια τους. Επιπλέον, υπήρξε μία συντονισμένη προσπάθεια, της βιομηχανίας και των ερευνητών στο να προοδεύουν τον τομέα της μεταποίησης των τροφίμων καθώς και της συντήρησης αυτών, και να εφαρμόσουν αντιμικροβιακές μεθόδους σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας με σκοπό τον έλεγχο των παθογόνων και τοξικών παραγόντων στα τρόφιμα, ώστε να τα καταστήσουν ασφαλή.

Τόσο τα τρόφιμα φυτικής, όσο και τα ζωικής προέλευσης, φέρουν στην επιφάνεια τους φυσική μικροχλωρίδα. Ωστόσο και στις δύο κατηγορίες τροφίμων υπάρχει μεγάλη πιθανότητα μόλυνσης από εξωγενείς παράγοντες. Ωστόσο, τόσο στους ζωικούς εσωτερικούς υγείς ιστούς, όσο και στους φυτικούς, απαντούν ελάχιστοι έως και μηδενικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί (Sofos J. et al., 2003).

Οι μικροοργανισμοί που απαντώνται στα τρόφιμα, διακρίνονται στους μύκητες, τις ζύμες και τα βακτήρια. Οι περισσότεροι μύκητες και οι ζύμες προκαλούν αλλοίωση στα τρόφιμα. Επιπλέον, αποτελούν τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους μικροοργανισμούς στην βιομηχανία τροφίμων, εξαιτίας της ικανότητάς τους να ζυμώνουν τους υδατάνθρακες προς παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα.

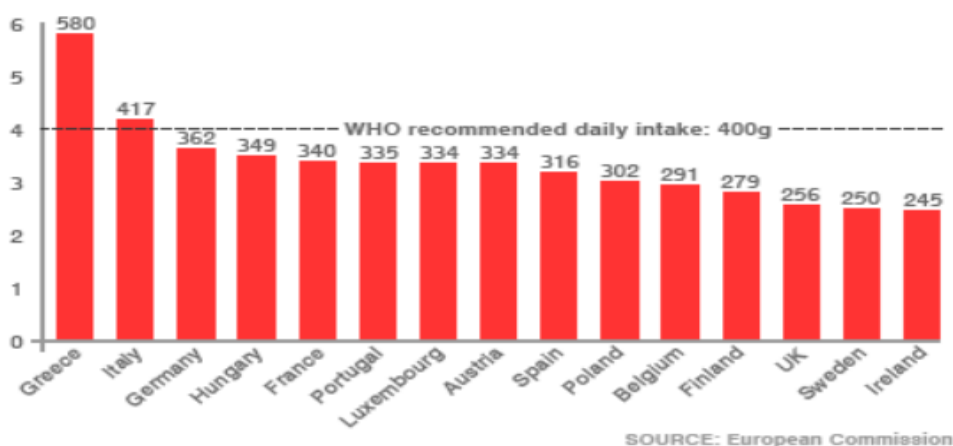
Τα βακτήρια που απαντώνται στα τρόφιμα, διαχωρίζονται στα «επιθυμητά» που είναι εκείνα που επάγουν την διαδικασία της ζύμωσης (π.χ. *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Propionibacterium*), και στα «μη επιθυμητά». Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται τα αλλοιογόνα (π.χ. *Pseudomonas sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.*) και παθογόνα βακτήρια (π.χ. *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter sp.*).

1.2 Η αξία των λαχανικών στην διατροφή

Τα λαχανικά είναι σημαντικά στοιχεία μιας υγιεινής, ισορροπημένης διαίτας, είτε ως μέρος ενός κυρίως γεύματος είτε ως σνακ. Προμηθεύουν τον οργανισμό με βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και διαιτητικές ίνες, με ενέργεια (κυρίως με τη μορφή σακχάρων), καθώς και με ορισμένα συστατικά, συχνά αναφερόμενα ως φυτοχημικά ή δευτερογενή φυτικά προϊόντα, τα οποία υπάρχουν σε ελάχιστες ποσότητες, και είναι δυνητικά ωφέλιμα για την υγεία μας. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες η υψηλή κατανάλωση λαχανικών έχει συσχετιστεί με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων, και συγκεκριμένα καρδιαγγειακών παθήσεων (Mirmiran P. et al., 2009 και Rissanen T.H. et al., 2003), διαβήτη τύπου 2 (Harding A.H. et al., 2008), και ορισμένων μορφών καρκίνου, όπως της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα, του λάρυγγα, του οισοφάγου, του στομάχου και των πνευμόνων (World Cancer Research Fund (WCRF) Panel, 2007).

Σύμφωνα με έρευνες έχει βρεθεί ότι τα λαχανικά καταναλώνονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην Ελλάδα και την Ιταλία όπου τα φρούτα και τα λαχανικά αντιπροσωπεύουν τουλάχιστον το ένα τέταρτο της γεωργικής παραγωγής (Γράφημα 1).

Γράφημα 1. Μέση ημερήσια πρόσληψη λαχανικών στις Ευρωπαϊκές χώρες (European Commission, 2008).



1.3 Οι μικροοργανισμοί στα λαχανικά

Τα λαχανικά, κατά το πλείστον, είναι πλούσια σε υδατάνθρακες και το pH τους κυμαίνεται από 5,0 έως 7,0. Οι ιδιότητες αυτές δημιουργούν ένα πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη μικροοργανισμών –είτε αλλοιογόνων, είτε παθογόνων. Έτσι, δεδομένου ότι συνήθως καταναλώνονται ωμά, γεννάται το ερώτημα για το κατά πόσο μπορούν να αποτελέσουν μία ασφαλή για την υγεία μας τροφή.

Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στα λαχανικά, ποικίλλουν και μπορεί να προέρχονται από διάφορες πηγές, όπως το έδαφος, το νερό, ο αέρας, τα έντομα, τα πουλιά ή ακόμα και από τον εξοπλισμό που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία τους (Silliker J.H. et al., 1980). Στα φυλλώδη, για παράδειγμα λαχανικά, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί προέρχονται από τον αέρα, ενώ στους κονδύλους προέρχονται από το έδαφος.

Το ποσοστό εμφάνισης των μικροοργανισμών στα λαχανικά, αντικατοπτρίζει τις συνθήκες της υγιεινής κατάστασης, που επικρατούν κατά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας τους, καθώς επίσης και τον αριθμό του αρχικού μικροβιακού φορτίου. Σε μία μελέτη που έγινε σε μαρούλι (Splittstoesser et al., 1980), μετρήθηκε ο πληθυσμός της ολικής μικροχλωρίδας πριν το στάδιο του ζεματίσματος (blanching) και έδειξε ότι κυμαίνεται από 5,6 έως 6,0 log CFU/g. Μετά το ζεμάτισμα, ο συνολικός πληθυσμός, μειώθηκε στους 3,0-3,6 log CFU/g. Όταν το προϊόν πέρασε από διάφορα στάδια επεξεργασίας και συσκευασίας ο συνολικός πληθυσμός της ολικής μικροχλωρίδας κυμαίνονταν από 4,7 έως 5,9 log CFU/g.

Το ίδιο φαινόμενο παρουσιάστηκε και στην περίπτωση του αρακά και του καλαμποκιού, όπου το μικροβιακό φορτίο κυμαίνονταν από 4,9 έως 5,9 log CFU/g, πριν την διαδικασία του ζεματίσματος. Ωστόσο, ο αριθμός αυτός μειώθηκε μετά το στάδιο του ζεματίσματος, ενώ άρχισε να παρουσιάζεται μία σταδιακή αύξηση μετά από κάθε στάδιο επεξεργασίας.

Στα λαχανικά συναντώνται και οι δύο μεγάλες κατηγορίες βιολογικών κινδύνων- μύκητες, βακτήρια. Οι μύκητες που συνήθως απαντώνται είναι οι *Penicillium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis*, και *Aspergillus*. Τα πιο συχνά απαντώμενα βακτήρια στα λαχανικά είναι τα γαλακτικά, καθώς και τα γένη *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Escherichia*,

Salmonella, *Clostridium* και *Enterococcus*. Ορισμένα από τα γένη βακτηρίων που απαντώνται στα λαχανικά είναι εντερικής προελεύσεως. Τα γένη αυτά εμφανίζονται στα λαχανικά στις περιπτώσεις που προηγουμένως έχει γίνει λίπανση με κοπριά ζώων ή άρδευση με μολυσμένο νερό.

Η κατανάλωση ωμών λαχανικών, που έχουν προσβληθεί από παθογόνους μικροοργανισμούς μπορεί να προκαλέσει τροφιμογενείς ασθένειες όπως λιστερίωση, σαλμονέλλωση, αλλαντίαση κ.α. (Manios S. et al., 2013). Ορισμένες από αυτές τις ασθένειες είναι ιδιαίτερος σοβαρές και μπορεί να προκαλέσουν ακόμα και θάνατο.

Προκειμένου να επιβραδυνθεί η αλλοίωση των λαχανικών από τους μικροοργανισμούς αλλά και να αποφευχθούν τα τροφιμογενή νοσήματα, ακολουθούνται διάφορες μέθοδοι συντήρησης, όπως η διατήρησή τους σε χαμηλή θερμοκρασία και υγρασία, η συσκευασία σε κενό ή η τροποποιημένη ατμόσφαιρα, η θερμική επεξεργασία καθώς και η προσθήκη χημικών συντηρητικών.

1.4 Λαχανικά έτοιμα προς κατανάλωση

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι γρήγοροι ρυθμοί ζωής, το γεγονός ότι πλέον οι περισσότερες γυναίκες εργάζονται εκτός σπιτιού σε συνδυασμό με την επιθυμία των καταναλωτών για τα όσο το δυνατόν λιγότερο επεξεργασμένα τρόφιμα, καθώς και την στροφή στον υγιεινό τρόπο διατροφής, έχουν οδηγήσει στην αύξηση της κατανάλωσης των έτοιμων-προς-κατανάλωση λαχανικών (ready-to-use, RTU / ready-to-eat, RTE), παγκοσμίως.

Διαφορετικά λαχανικά (μαρούλι, λάχανο, καρότο, κ.α.), συσκευάζονται σε ειδικούς περιέκτες και διατίθενται προς πώληση, για την χρήση τους ως σαλάτα. Η συντήρησή τους γίνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Η συσκευασία των λαχανικών, σε περιέκτες χαμηλής διαπερατότητας σε οξυγόνο, αποτρέπουν την ενζυμική αμάυρωση και κατά συνέπεια την υποβίβαση της ποιότητάς τους (Manios S. et al., 2013).

Τα RTE λαχανικά κατά την προετοιμασία τους καθίστανται όσο το δυνατόν πιο στείρα από μικροοργανισμούς, καθώς εμβαπτίζονται σε νερό που περιέχει χλώριο σε ποσότητα 50 έως 200 ppm, αμέσως πριν την κοπή τους. Μετά την κοπή ακολουθεί η συσκευασία τους. Μολονότι με το πλύσιμο μειώνεται το συνολικό μικροβιακό φορτίο που απαντάται στα λαχανικά, κατά την κοπή και την συσκευασία τους, μπορεί

να προκληθεί επιμόλυνση. Επιπλέον, τα φρεσκοκομμένα λαχανικά, έχουν υψηλή υγρασία καθώς και περισσότερα θρεπτικά συστατικά, ιδιότητες οι οποίες τα καθιστούν περισσότερο ευάλωτα στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Odumeru, J.A., 1997).

Σε μία μελέτη (Babic et al, 1996), που έλαβε χώρα στο Οντάριο του Καναδά, συλλέχθηκαν οχτώ δείγματα RTE λαχανικών στα οποία μετρήθηκε η ολική μεσόφιλη μικροχλωρίδα τους την μηδενική ημέρα και μετά από 4 ημέρες συντήρησής τους στους 4°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Μέτρηση δειγμάτων RTU λαχανικών (log CFU/g), αποθηκευμένα στους 4°C ^a.

Προϊόν	Ημέρα 0	Ημέρα 4
Μαρούλι	4,85	5,63
Μίγμα σαλάτας	5,35	6,05
Κουνουπίδι	4,82	5,45
Σέλινο	5,67	6,59
Λάχανο	5,14	6,95
Καρότο	5,13	6,27
Μπρόκολο	5,58	6,59
Πράσινες πιπεριές	5,99	7,22

^a Τα προϊόντα έχουν χρόνο ζωής 7 ημέρες.

Πηγή: Δεδομένα από Odumeru et al., 1997.

Όπως φάνηκε από δειγματοληψία των λαχανικών, ο αρχικός πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης μικροχλωρίδας κυμαίνονταν από 4,8 έως και 6,0 log CFU/g λαχανικών (μηδενική ημέρα), ενώ μετά από συντήρησή 4 ημερών στους 4°C, ο πληθυσμός κυμάνθηκε από 5,4 έως 7,0 log CFU/g λαχανικών. Παράλληλα, μετρήθηκε ο πληθυσμός των κολοβακτηριδίων και βρέθηκε ότι κυμαίνονταν από 5,1 έως 7,2 log CFU/g λαχανικών, αλλά δεν ανιχνεύθηκαν *E. coli* βακτήρια. Οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί ήταν οι *Pseudomonas* και *Pantoea*. Σε μία δεύτερη μελέτη, ο πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης μικροχλωρίδας των RTE λαχανικών στο στάδιο της συγκομιδής κυμαίνονταν περίπου από 5,0 έως 8,0 log CFU/g λαχανικών, ενώ μετά από αποθήκευσή τους στους 7°C, ο πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης μικροχλωρίδας

την στιγμή της πώλησης, για 12 δείγματα λαχανικών, κυμαίνονταν μεταξύ 7,7 και 9,0 log CFU/g λαχανικών. Σε όλα τα δείγματα, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ήταν αποδεκτά.

1.5 Παθογόνοι μικροοργανισμοί στα RTU λαχανικά

Σύμφωνα με αρκετές μελέτες που έχουν υλοποιηθεί στο παρελθόν, για την ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών, στα έτοιμα-προς-κατανάλωση λαχανικά, την μεγαλύτερη ανησυχία προκαλεί ο *Clostridium botulinum*.

Σε μελέτη που διεξήχθη (Larson et al., 1997), πέντε διαφορετικά RTU λαχανικά (μπρόκολο, λάχανο, μαρούλι, πράσινα φασόλια και καρότο), εμβολιάστηκαν με ένα κοκτέιλ 10 στελεχών -επτά πρωτεολυτικών και τριών μη πρωτεολυτικών- του *Clostridium botulinum*. Κατόπιν αναλύσεων, βρέθηκε η τοξίνη του *Clostridium botulinum* σε όλα τα δείγματα μπρόκολου τα οποία συντηρήθηκαν στους 21°C και είχαν υποστεί αλλοίωση σε προχωρημένο βαθμό, καθώς και στα μισά από τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 12°C. Επιπλέον, η τοξίνη ανιχνεύθηκε και στο ένα τρίτο των δειγμάτων μαρουλιού που συντηρήθηκαν στους 21°C. Η τοξίνη δεν ανιχνεύθηκε πριν την εμφάνιση αλλοίωσης των δειγμάτων, καθώς επίσης και στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 12°C. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το υλικό συσκευασίας που χρησιμοποιήθηκε για την συγκεκριμένη μελέτη, είχε συντελεστή περατότητας οξυγόνου (OTR) που κυμαινόταν από 3,000 έως 16,544, και τα λαχανικά σφραγίστηκαν υπό κενό. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το μπρόκολο ήταν συσκευασμένο σε συσκευασία με OTR από 13,013 έως 16,544, ενώ το λάχανο στο οποίο δεν ανιχνεύθηκε η τοξίνη συσκευάστηκε σε συσκευασία με OTR που κυμαινόταν από 3,000 έως 8,000. Οι συσκευασίες των δειγμάτων του μπρόκολου συντηρήθηκαν στους 21°C για χρονικό διάστημα επτά ημερών, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (<2% O₂ και περίπου 12% CO₂), ενώ οι συσκευασίες των δειγμάτων μαρουλιού στους 21°C, για έξι ημέρες σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (έως 40% CO₂). Η ολική μεσόφιλη μικροχλωρίδα των αλλοιωμένων προϊόντων κυμαίνονταν στο φάσμα των 8 με 9 λογαρίθμων.

Από την παραπάνω μελέτη παρουσιάζεται η αυξημένη συχνότητα της εμφάνισης του *Clostridium botulinum* στα RTE λαχανικά. Ωστόσο εξίσου σημαντική είναι η θερμοκρασία και ο χρόνος συντήρησης των RTE λαχανικών, προκειμένου να

αποτραπεί η εμφάνιση όχι μόνο του *Clostridium botulinum*, αλλά και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών.

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, έχει αποδειχθεί ότι αναπτύσσεται σε κατεψυγμένα κυρίως λαχανικά, συμπεριλαμβανομένων του μαρουλιού, του μπρόκολου, του κουνουπιδιού και των σπαραγγιών (Beuchat, L.R., 1990).

Κατά την διεξαγωγή έρευνας, που διεξήχθη στον Καναδά το 2002, για τα καταγεγραμμένα κρούσματα τροφιμογενών ασθενειών που σημειώθηκαν τα έτη 1981-1999, προέκυψε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό τροφίμων που τις προκάλεσαν ήταν τα λαχανικά (κυρίως λάχανο, μαρούλι, μαϊντανός, καρότο) (Sewell, A.M., 2001). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι τα λαχανικά δεν υπόκειται σε κάποια διεργασία θανάτωσης των παθογόνων μικροοργανισμών, μετά την κοπή τους. Η πιθανότητα να μεταφερθούν παθογόνοι μικροοργανισμοί μέσω της διασταυρούμενης επιμόλυνσης με αποτέλεσμα να τα καταστήσουν μη ασφαλή, είναι αυξημένη. Δεδομένου ότι τα λαχανικά καταναλώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό ωμά είναι μεγάλη η πιθανότητα να νοσήσει ο καταναλωτής. Οι κυριότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί που σημειώθηκαν ως αιτία των κρουσμάτων ήταν οι *E. coli O157:H7*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei* και *Staphylococcus aureus* (Sewell, A.M., 2001).

1.6 Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Escherichia coli*

1.6.1 Εισαγωγή και ιστορικά δεδομένα

Το 1885 απομονώθηκε για πρώτη φορά ο μικροοργανισμός *Escherichia coli*, από παιδικά περιττώματα, και στη συνέχεια περιγράφηκε, από τον γερμανό Theodor Escherich, ο οποίος έδωσε και το όνομά του στο βακτήριο. Έκτοτε, η επιστημονική κοινότητα εστιάστηκε σε τέτοιο βαθμό στον μικροοργανισμό, ώστε σήμερα θεωρείται ο πιο μελετημένος μικροοργανισμός. Η κύρια πηγή του *E. coli* είναι το έντερο των ανθρώπων και άλλων θερμόαιμων ζώων, όπου παρότι αποτελεί μόνο ένα μικρό μέρος της συνολικής μικροχλωρίδας, είναι ο κυρίαρχος προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός. Παρά το γεγονός ότι ως συμβιώτης είναι αβλαβής, κατά καιρούς, μπορεί να προκαλεί διάφορες μολύνσεις όπως Gram αρνητική σηψαιμία, μολύνσεις

της ουροδόχου κύστεως, πνευμονία σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς καθώς και μηνιγγίτιδα στα νεογνά. Το κοινό φαινόμενο της παρουσίας του μικροοργανισμού στα περιττώματα, ο γενικά μη παθογενής χαρακτήρας του, καθώς και τα χαρακτηριστικά επιβίωσής του στο νερό, οδήγησαν στην υιοθέτηση του μικροοργανισμού ως δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης και πιθανής παρουσίας εντερικών παθογόνων, όπως το βακτήριο *Salmonella typhi* στο νερό. Αυτή η χρήση έχει μεταφερθεί στα τρόφιμα, όπου απαιτείται μεγαλύτερη προσοχή στην ερμηνεία της σημασίας των θετικών αποτελεσμάτων. Κατά την διάρκεια του θέρους του έτους 1940, στελέχη *E. coli*, αναγνωρίστηκαν αρχικά ως αιτία της γαστρεντερίτιδας στα νήπια της Αγγλίας. Έως το 1982, τα στελέχη που ευθύνονται για την διάρροια ταξινομήθηκαν σε τρεις τύπους βασισμένους στην ικανότητά τους για πρόκληση ασθενειών (virulence):



Εικόνα 1 Μικροσκοπική απεικόνιση των βακίλων του βακτηρίου *E. coli*
http://www.colonista.com/my_weblog/2010/11/harmful-viruses-and-bacteria-lets-start-with-ecoli.html

- Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (enteropathogenic *E. coli* -EPEC),
- Εντεροδιδεισδυτικά στελέχη *E. coli* (enteroinvasive *E. coli* - EIEC) και
- Εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli* (enterotoxigenic *E. coli* -ETEC).

Τα παραπάνω στελέχη δεν αποτελούν πολύ κοινές αιτίες τροφιμογενούς ασθένειας στις ανεπτυγμένες χώρες, αλλά σίγουρα αποτελούν μια σημαντική αιτία της παιδικής διάρροιας στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες. Τα εντεροτοξιγόνα στελέχη *E. coli* (ETEC), συχνά συνδέονται με την αποκαλούμενη «διάρροια του ταξιδιώτη».

Το 1982, τα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC) και ιδιαίτερα ο ορότυπος O157:H7, αναγνωρίστηκε ως αίτιο επιδημιολογικών εξάρσεων αιμορραγικής κολίτιδας και αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (haemolytic-uremic syndrome – HUS), ιδιαίτερα στην Βόρεια Αμερική, όπου έχουν εμπλακεί στην

πρόκλησή τους, τρόφιμα όπως ο μη επαρκώς ψημένος κιμάς, το νοπό γάλα και οι φρέσκοι χυμοί.

Αρχικά, υπήρξε μια εκθετική άνοδος των κρουσμάτων του οροτύπου O157:H7 στον Καναδά μεταξύ 1982 και 1986. Στην συνέχεια, ύστερα από μία σχετική έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο μεταξύ 1985 και 1988, παρατηρήθηκε και εκεί μια αυξητική πορεία των κρουσμάτων (118 στην Αγγλία και τη Ουαλία και 86 στην Σκωτία). Ο αριθμός των κρουσμάτων στο Ηνωμένο Βασίλειο, συνέχισε να αυξάνεται έως το 1997 και έκτοτε κυμαίνεται μεταξύ 600 και 1000 κρουσμάτων το χρόνο.

Δύο ακόμα τύποι του βακτηρίου *E. coli* αναγνωρίστηκαν ως διαρροϊκές αιτίες, πρωτίστως στα παιδιά (Enter-aggregative *E. coli* – EaggEC και diffusely adherent *E. coli* - DAEC) (Begue et al., 1998 - Bacon and Sofos, 2003 - Buchanan and Doyle, 1997 - Giron et al., 1991 - Nataro και Kapar, 1998), οι οποίες δρουν μέσω προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Η απόκτηση, η απώλεια ή η αναδιοργάνωση των γενετικών στοιχείων εισάγουν νέα χαρακτηριστικά παθογένειας και ικανότητας για προσβολή.

1.6.2 Ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* και τα χαρακτηριστικά του

Ο μικροοργανισμός *E. coli*, είναι ένα Gram-αρνητικό, προαιρετικά αναερόβιο και μη σπορογόνο βακτήριο, που ανήκει στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *Salmonella spp.* και *Shigella spp.* Ο μικροοργανισμός *E. coli* είναι θετικός στην καταλάση και αρνητικός στο τεστ της οξειδάσης. Τα κύτταρά του, έχουν μήκος περίπου 2 μm και διάμετρο 0,5 μm ενώ ο όγκος τους είναι 0,6 – 0,7 μm³ (Kubitschek 1990) και η κίνηση τους υποβοηθείται από περίτριχα μαστίγια που διαθέτουν γύρω από το κύριο σώμα του βακίλου (Εικόνα 2).

Το βακτήριο είναι γνωστό για την ικανότητά του να προσαρμόζεται και να αποικίζει σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Έχει παρατηρηθεί ότι υπό αναερόβιες συνθήκες παράγει γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ, και διοξείδιο του άνθρακα. Λόγω του ότι πολλά μεταβολικά μονοπάτια απελευθερώνουν υδρογόνο, ο μικροοργανισμός *E. coli*, συμβιώνει με μεθανογενετικούς μικροοργανισμούς ή θειοαναγωγικά βακτήρια, προκειμένου αυτά, να μειώνουν τα επίπεδα υδρογόνου

(Madigan και Martinko, 2006) και να καταστήσουν το περιβάλλον πιο ευνοϊκό για την ανάπτυξη του *E. coli*.

Ο μικροοργανισμός *E. coli*, είναι μεσόφιλος και αναπαράγεται σε θερμοκρασίες από 7 έως 45°C. Κάτω από ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας (35 έως 42°C και 95 έως 104°F), το παθογόνο μπορεί να αναπαραχθεί σε τιμές pH από 4 έως 10 και υπό την παρουσία 8% χλωριούχου νατρίου. Η ελάχιστη ενεργότητα νερού (a_w) που απαιτείται για την

επιβίωση και ανάπτυξή του είναι ίση με 0,95 (ICMSF, 1980). Είναι σημαντικό, ωστόσο να σημειωθεί ότι η επέμβαση σε έναν ή περισσότερους από τους παραπάνω παράγοντες, μπορεί να επηρεάσει τα μέγιστα και τα ελάχιστα



άλλων παραγόντων που, επίσης, συμβάλλουν στην μικροβιακή επιβίωση ή ανάπτυξη (Bacon and Sofos, 2003).

Εικόνα 2 Τα κύτταρα του *E. coli* κινούνται με την χρήση μαστιγίων, που σχηματίζουν δέσμες, που παράγουν ροπή, για να περιστρέψουν το βακτήριο δεξιόστροφα http://www.nsf.gov/news/news_summ.jsp?cntn_id=104283&previ_ew=false

Ενώ τα περισσότερα στελέχη του *E. coli* δεν είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, κάποιοι ορότυποι είναι υπεύθυνοι για τρεις βασικούς τύπους νόσων: α) μηνιγγίτιδα των νεογνών, β) χρόνια λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, και γ) γαστρεντερίτιδα (Buchanan and Doyle, 1997, Johnson et al., 2002).

Το βακτήριο *E. coli*, μπορεί να διαφοροποιηθεί από τα άλλα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, στη βάση βιοχημικών δοκιμών. Μία αρκετά συνηθισμένη και σημαντική ομάδα δοκιμών, χρησιμοποιούμενων για αυτό τον λόγο, είναι γνωστή από το αρτικόλεξο **IMViC**. Αυτό το τεστ εξετάζει την δυνατότητα των μικροοργανισμών να:

- i. Παράγουν ινδόλη και τρυπτοφάνη (I)

- ii. Παράγουν επαρκή ποσότητα οξέος για να μειωθεί το pH του μέσου κάτω από 4.4, που είναι το ισοδύναμο σημείο του δείκτη ερυθρό του μεθυλίου(M),
- iii. Παράγουν ακετοΐνη και
- iv. Χρησιμοποιούν το κιτρικό οξύ (C).

Πίνακας 2. Δοκιμή του IMViC.

	Ινδόλη	Ερυθρό του Μεθυλίου	Voges Proskauer	Κιτρικό οξύ
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Shigella</i>	V	+	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	+	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+

Δεδομένου ότι η παραγωγή οξέων και ακετυλομεθυλοκαρβινόλης είναι εναλλακτικές οδοί για τον μεταβολισμό του πυροσταφυλικού οξέος, τα περισσότερα είδη εντεροβακτηριδίων είναι θετικά, είτε στο Voges Proskauer (VP) τεστ, είτε στο ερυθρό του μεθυλίου. Στη δοκιμή IMViC, τα περισσότερα στελέχη *E. coli*, είναι θετικά στο τεστ της ινδόλης και του ερυθρού του μεθυλίου και αρνητικά στα τεστ VP και κιτρικού οξέος (Πίνακας 2).

1.6.3 Εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC)

Το στέλεχος EHEC, γνωστό ως *E. coli* παράγουσα βεροτοξίνη (Verotoxin – producing *E. coli* – VTEC), περιγράφηκε αρχικά στον Καναδά όπου σε μερικές περιοχές συναγωνίζεται τα βακτήρια *Campylobacter spp.* και *Salmonella spp.* ως πιο συχνή αιτία διαρροϊκών συμπτωμάτων. Ο ορότυπος *E. coli* O157:H7, είναι ο πιο κοινά αναφερόμενος. Τα στελέχη EHEC έχουν κερδίσει το παγκόσμιο επιστημονικό

ενδιαφέρον, όχι μόνο επειδή η τροφική μετάδοση είναι πιο κοινή, συγκριτικά με οποιοδήποτε άλλο στέλεχος *E. coli* που προκαλεί διαρροϊκά συμπτώματα, αλλά και επειδή η ασθένεια που προκαλεί μπορεί να κυμανθεί από μια μη-αιμορραγική διάρροια, μέσω της αιμορραγικής κολίτιδας, έως το απειλητικό για την ζωή αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Haemolytic Uraemic Syndrome – HUS) και τη θρομβωτική θρομβοκυτοπενική ερυθρίαση (Thrombotic Thrombocytopenic Purpura – TTP) (Karmali et al., 1983 - Grotorex και Thorne, 1994 - Konowalchuk et al., 1997).

Τα συμπτώματα της αιμορραγικής κολίτιδας υποχωρούν από μόνα τους με την πάροδο του χρόνου, αφού αρχικά προκαλέσουν μια οξεία, αιμορραγική διάρροια που διαρκεί 4-10 ημέρες. Τα συμπτώματα αρχίζουν με στομαχικές κράμπες και υδατώδη διάρροια για 1-2 (μερικές φορές 3-8) ημέρες, μετά την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, και στις περισσότερες περιπτώσεις, κατά την διάρκεια των επόμενων 1-2 ημερών, εξελίσσονται σε μια αιματηρή διάρροια, με δριμύ κοιλιακό πόνο. Διακρίνεται από την τυπική κολίτιδα, από την έλλειψη πυρετού και την απουσία λευκοκυττάρων στον εμετό. Έχει επιπτώσεις κυρίως στους ενηλίκους, με μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης κατά τους θερινούς μήνες, και μπορεί να είναι απειλητική για την ζωή των ηλικιωμένων. Το HUS διαθέτει τρία χαρακτηριστικά γνωρίσματα, την οξεία νεφρική ανεπάρκεια, την αιμολυτική αναιμία (μείωση του αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων), και την θρομβοκυτοπενία (μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων του αίματος), που προηγείται μερικές φορές της αιματηρής διάρροιας. Εμφανίζεται πολύ συχνά σε παιδιά, όπου είναι η κύρια αιτία της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας στην Δυτική Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική. Περίπου 10% των παιδιών κάτω των 10 ετών που μολύνθηκαν με *E. coli* O157:H7, τείνουν να εμφανίσουν HUS και το 50% εξ αυτών χρειάζονται αιμοκάθαρση, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας ανέρχεται γενικά στο 3-5%. Σε 70 περιπτώσεις κρουσμάτων στο Λονδίνο, μεταξύ του χρονικού διαστήματος 1980 και 1986, το ποσοστό των μοιραίων περιστατικών ήταν 6-13% και αποτελούνταν από άτομα που εμφάνιζαν μακροχρόνια νεφρική βλάβη. Σε έναν οίκο ευγηρίας στη Βόρειο Αμερική, το ποσοστό θνησιμότητας εκ του συνόλου 55 ασθενών ήταν 31%.

Η θρομβωτική θρομβοκυτοπενική ερυθρίαση είναι μια λιγότερο κοινή επιπλοκή που είναι κατά ένα μεγάλο μέρος περιορισμένη σε ενηλίκους. Συσχετίζεται

με το HUS, αλλά προκαλεί μικρότερη βλάβη στους νεφρούς και περιλαμβάνει πυρετό και νευρολογικά συμπτώματα ως αποτέλεσμα των θρόμβων αίματος στον εγκέφαλο.

1.6.4 Συσχετισμός με τα τρόφιμα

Πηγή του παθογόνου *E. coli*, είναι πιθανώς η εντερική οδός των ζώων, κυρίως των γαλακτοπαραγωγών, χωρίς όμως να τους προκαλεί συμπτώματα. Τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, ιδιαίτερα ο βόειος κιμάς, έχει υπάρξει αιτία για πολλά κρούσματα στις ΗΠΑ, την Ευρώπη και τον Καναδά.

Το 1993, εκδηλώθηκε ένα κρούσμα, κατά το οποίο προσβλήθηκαν πάνω από 500 άτομα και σε 4 από τα οποία προκλήθηκε θάνατος. Το συμβάν αυτό, προκλήθηκε από την κατανάλωση χάμπουργκερ μιας αλυσίδας σε-food στην Ουάσιγκτον, Νεβάδα, Όρεγκον, και Καλιφόρνια. Τα χάμπουργκερ, ήταν μολυσμένα από τον παθογόνο *E. coli* O157:H7, και στην συνέχεια μαγειρεύτηκαν σε ανεπαρκή για την θανάτωσή του θερμοκρασία. Εκτός από τον βόειο κιμά, και άλλα τρόφιμα, έχουν υπάρξει ως αιτία πρόκλησης κρουσμάτων. Τέτοια τρόφιμα είναι το νωπό γάλα, ο χυμός μήλου, ορισμένα φρούτα, τα άψητα λουκάνικα, και οι σαλάτες.

Έρευνες έδειξαν την παρουσία του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 σε πολλούς διαφορετικούς τύπους τροφών ζωικής προέλευσης, όπως το βόειο και το χοιρινό κρέας, τα πουλερικά, το αρνί, και σε χαμηλότερα ποσοστά στο νωπό γάλα.

1.6.5 Προφυλάξεις και Έλεγχος

Απαραίτητες πρακτικές για τον έλεγχο της παρουσίας του *E. coli* O157:H7 σε έτοιμα-προς-κατανάλωση τρόφιμα, είναι η εφαρμογή ορθής υγιεινής, το μαγείρεμα και η θέρμανση των τροφίμων σε κατάλληλες θερμοκρασίες, η κατάλληλη ψύξη, και η προφύλαξη από την διασταυρούμενη επιμόλυνση.

Το Κέντρο Επιθεώρησης της Ασφάλειας των Τροφίμων των Ηνωμένων Πολιτειών (FSIS), διεξήγαγε κάποιες κατευθυντήριες γραμμές για τον έλεγχο πρόκλησης τροφιμογενών νοσημάτων, από αυτόν τον εν λόγω παθογόνο:

- ✓ να γίνεται η χρήση μόνο παστεριωμένου γάλακτος,
- ✓ να γίνεται γρήγορη ψύξη ή κατάψυξη των ευπαθών τροφίμων,
- ✓ να γίνεται η απόψυξη ενός τροφίμου σε θερμοκρασία δωματίου,

- ✓ να μην παραμένει για περισσότερο των 2 ωρών ένα κατεψυγμένο τρόφιμο σε θερμοκρασία δωματίου,
- ✓ να γίνεται σχολαστικό πλύσιμο με ζεστό νερό και σαπούνι των χεριών, των σκευών και των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με το τρόφιμο,
- ✓ να μαγειρεύεται το κρέας ή τα μπιφτέκια μέχρι να γίνουν γκρι ή καφέ στο κέντρο τους.

1.7 Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*

1.7.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία

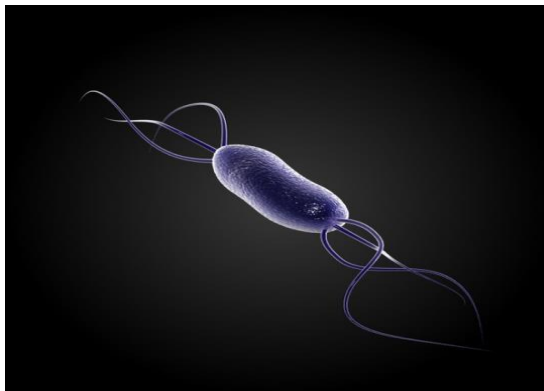
Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* αποτελεί την αιτία για την ανθρώπινη και ζωική λιστερίωση, για αυτό και είναι ένας από τους πιο μελετημένους μικροοργανισμούς των τελευταίων 20 ετών. Αν και είχε γίνει αναφορά στον μικροοργανισμό από το 1891, πρώτος ο Murray περιέγραψε αυτό τον μικροοργανισμό ως αιτία για την ζωική ασθένεια το 1926. Λόγω του γεγονότος ότι το παθογόνο προκαλούσε μονοκύτωση, έλαβε την ονομασία *Bacterium monocytogenes*, η οποία στην πορεία άλλαξε σε *Listeria monocytogenes*, προς τιμήν του Λόρδου Lister. Η ονομασία *Listeria monocytogenes* έγινε αποδεκτή τελικά το 1940, ενώ η πρώτη απομόνωση στελέχους έγινε το 1929. Εντούτοις, το ενδιαφέρον για τον εν λόγω μικροοργανισμό αυξήθηκε γρήγορα, μετά από μια σειρά τροφικών δηλητηριάσεων, κατά την δεκαετία του '80. Το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ αυτών των κρουσμάτων έχει επιστήσει την προσοχή των ανθρώπων που συμμετέχουν στην υγιεινή και ασφάλεια των τροφίμων.

1.7.2 Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* και τα χαρακτηριστικά του

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* είναι ένας θετικός κατά Gram, μικροαερόφιλος, μη-σπορογόνος βάκιλος, με διάμετρο 0,4-0,5 μm και μήκος 0,5-2μm. Το βακτήριο είναι ιδιαίτερα κινητικό. Η κίνησή του υποβοηθείται με την χρήση τεσσάρων περίτριχων μαστιγίων και χαρακτηριστικό της είναι η περιστροφική κίνηση που χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης για τον προσδιορισμό της. Ο βαθμός της κινητικότητάς του εξαρτάται από την θερμοκρασία, και είναι μέγιστος όταν η θερμοκρασία αύξησής του κυμαίνεται μεταξύ 20°C και 25°C. Από 37°C και πάνω, η

παραγωγή μαστιγίων μειώνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα μείωση της κινητικότητας του (Lovett, 1989 – Farber και Peterkin, 1991).

Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 30-37°C αν και αυξάνεται καλά και σε θερμοκρασίες κοντά στους 4°C, ενώ ο ρυθμός αύξησης μειώνεται καθώς μειώνεται η θερμοκρασία. Το βέλτιστο εύρος pH είναι 5-9. Σε υπόστρωμα με βάση το άγαρ, οι αποικίες του βακτηρίου είναι διαφανείς με μια χαρακτηριστική γαλαζοπράσινη γυαλάδα. Ωστόσο η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί



Εικόνα 3 Μικροσκοπική απεικόνιση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*
<http://www.turbosquid.com/3d-models/microbes-micro-organisms-3d-model/644726>

και σε ορισμένα συνθετικά και ημισυνθετικά υποστρώματα, αλλά οι ρυθμοί ανάπτυξης είναι πολύ πιο αργοί από ότι στα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά υποστρώματα (Lovett, 1989 – Farber και Peterkin, 1991).

1.7.3 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Η διάσπαρτη παρουσία του παθογόνου στο περιβάλλον υποδηλώνει ότι η ανθρώπινη έκθεση στο παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* θα πρέπει να είναι συχνή. Ωστόσο, η πιθανότητα εκδήλωσης της λιστερίωσης είναι χαμηλή, δεδομένου, ότι η παθογένεια θα εκδηλωθεί μόνο εάν ένα ευαίσθητο άτομο εκτεθεί σε μια αρκετά υψηλή δόση κάποιου στελέχους. Η περίοδος που μεσολαβεί από την κατανάλωση του μικροοργανισμού μέχρι την εκδήλωση των συμπτωμάτων ποικίλει από 1 έως 90 ημέρες, γεγονός το οποίο καθιστά δύσκολο, εάν όχι αδύνατο, τον εντοπισμό των «ένοχων» τροφίμων. Τα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται συνήθως σε νήπια, ηλικιωμένους, εγκύους ή ανοσοκατεσταλμένους (YOPIs – young, old, pregnant, immunocompromised) και ποικίλουν από μία ήπια ασθένεια, τύπου γρίπης, μέχρι μηνιγγίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και ενδοκαρδίτιδα. Η λιστερίωση στους ενήλικες εμφανίζει υψηλό βαθμό θνησιμότητας, της τάξης του 35%.

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, είναι ένα προαιρετικό ενδοκυτταρικό παθογόνο, το οποίο μπορεί να επιζήσει και να πολλαπλασιαστεί στα

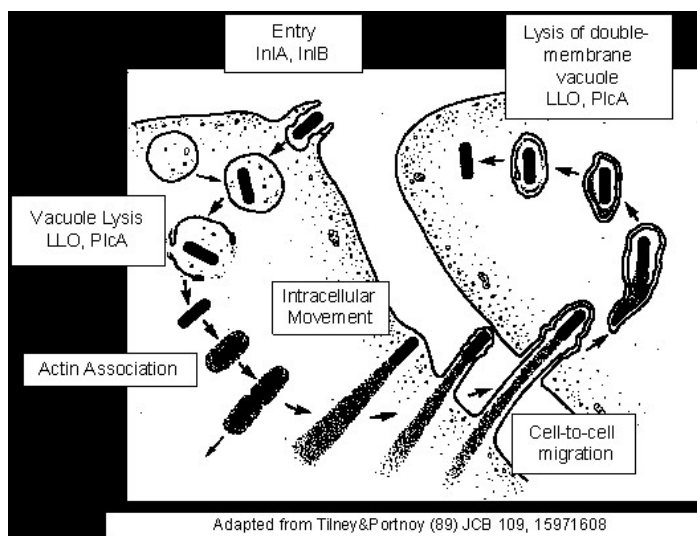
κύτταρα του συστήματος «μονοκύτταρο-μακροφάγο». Ο μικροοργανισμός διαπερνά το έντερο με την διαδικασία της ενδοκύτωσης, η οποία υποβοηθείται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της ιντερναλίνης, μιας βακτηριακής πρωτεΐνης. Αμέσως μόλις εισέλθει ο μικροοργανισμός στο έντερο, τα λευκά αιμοσφαίρια (μακροφάγα) αμύνονται ενάντια σε αυτόν, με σκοπό να τον καταστρέψουν.

Προκειμένου να πολλαπλασιαστεί ενδοκυτταρικά το βακτήριο, πρέπει να επιζήσει μέσα στο φαγόσωμα και να διαφύγει γρήγορα από τα μακροφάγα προτού καταστραφεί,

μία διαδικασία που θα θανατώσει το βακτήριο. Ο εν λόγω μικροοργανισμός, παράγει την λιστεριολυσίνη O (LLO), μια αιμολυσίνη μοριακού βάρους 58 kDa, που αποδομεί την διπλή λιπώδη μεμβράνη του φαγοσώματος και έτσι του επιτρέπει στο βακτήριο να δραπετεύσει.

Στην συνέχεια, το βακτήριο σχηματίζει ουρές σαν πυραύλους που περιέχουν

την F-ακτίνη. Οι ουρές αυτές ωθούν το βακτήριο να διαπεράσει την εξωτερική μεμβράνη των γειτονικών κυττάρων και να τα μολύνουν (Εικόνα 4). Μόνο το 10% των κυττάρων *Listeria monocytogenes*, που εισβάλλουν στα μονοκύτταρα επιβιώνει, το υπόλοιπο 90% καταστρέφεται.



Εικόνα 4 Απεικόνιση του τρόπου δράσης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*
<http://cmapspublic3.ihmc.us/rid=1GS0545KF-O1ZS64-2B0/Bacteriology>

1.7.4 Συσχετισμός με τα τρόφιμα

Η λιστερίωση είναι μία τροφιμογενής νόσος που εμφανίζεται σποραδικά στους ανθρώπους. Έχουν αναφερθεί στο παρελθόν κρούσματα, από την κατανάλωση μολυσμένης λαχανοσαλάτας, νωπού γάλακτος, μαλακού τυριού, και άλλων γαλακτικών προϊόντων, κρέατος, γαλοπούλας, και αλλαντικών.

Έχει αποδειχθεί ότι τα θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα τα οποία προκάλεσαν δηλητηριάσεις, είτε είχαν υποστεί ανεπαρκή θερμική επεξεργασία, είτε μολύνθηκαν μετά την θέρμανση. Πολλά ωμά προϊόντα, τόσο ζωικής όσο και φυτικής προέλευσης. Επιπλέον λιστερίωση έχει προκληθεί από την κατανάλωση τροφίμων που είχαν συντηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα στο ψυγείο.

Τα άτομα που προσβάλλονται πιο συχνά από την νόσο της λιστερίωσης, ανήκουν στην ομάδα των ευπαθών ατόμων. Η λιστερίωση μπορεί να προκαλέσει ακόμα και θάνατο σε αυτή την κατηγορία ατόμων.

1.7.5 Προφυλάξεις και έλεγχος

Δεδομένου ότι το παθογόνο *Listeria monocytogenes*, μπορεί να έχει ποικίλες πηγές, είναι αδύνατον να έχουμε τρόφιμα, πλήρως απαλλαγμένα από τον μικροοργανισμό. Ωστόσο, σε πολλές χώρες, έχει επιβληθεί η τήρηση από τις βιομηχανίες ενός αυστηρού προγράμματος για τον έλεγχο του παθογόνου. Αυτό το πρόγραμμα, έχει συμβάλει στην μείωση του αριθμού των κρουσμάτων λιστερίωσης σε σημαντικό βαθμό από το 1991. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, έχει υπάρξει μία σχετική αύξηση των κρουσμάτων, καθώς και των ανακλήσεων προϊόντων. Στις ΗΠΑ, σύμφωνα με την νομοθεσία, εάν βρεθεί παρουσία του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στα 25 g μαγειρεμένου, έτοιμου-προς-κατανάλωση κρέατος ή πουλερικού, τότε το προϊόν απορρίπτεται. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει η βιομηχανία που παρήγαγε το μολυσμένο προϊόν, να υποβληθεί σε σχολαστικό καθαρισμό, μέχρι να γίνει η παραγωγή προϊόντων πλήρως απαλλαγμένων από τον μικροοργανισμό.

Σύμφωνα με την νομοθεσία, εξέχουσας σημασίας είναι και η εκπαίδευση των καταναλωτών, προκειμένου να προφυλαχθούν από την λιστερίωση. Η εκπαίδευση περιλαμβάνει επαρκές μαγείρεμα των προϊόντων ζωικής προέλευσης, σχολαστικό πλύσιμο των ωμών λαχανικών πριν την κατανάλωσή τους, αποθήκευση σε ξεχωριστό χώρο των ωμών κρεάτων από τα έτοιμα-προς-κατανάλωση λαχανικά ή τρόφιμα, την αποφυγή κατανάλωσης νωπού γάλακτος, το σχολαστικό πλύσιμο χεριών, μαχαιριών και επιφανειών κοπής μετά την επαφή τους με ωμά τρόφιμα. Τέλος, υπάρχουν ειδικές και πιο αυστηρές συστάσεις για τα άτομα που ανήκουν στις ευπαθείς ομάδες.

1.8 Διασταυρούμενη επιμόλυνση

Κατά την επεξεργασία των τροφίμων ένα συχνό, αλλά ανεπιθύμητο φαινόμενο που παρατηρείται, είναι η μικροβιακή μεταφορά μεταξύ βιοτικών και αβιοτικών επιφανειών. Η μικροβιακή μεταφορά (βακτήρια, ιοί) μπορεί να γίνει είτε μέσω της **διασταυρούμενης επιμόλυνσης**, είτε μέσω της **επαναμόλυνσης**.



Με τον όρο διασταυρούμενη επιμόλυνση, αναφερόμαστε στην άμεση ή έμμεση, μικροβιακή μεταφορά, μεταξύ βιοτικών και αβιοτικών επιφανειών, ενώ με τον όρο επαναμόλυνση αναφερόμαστε στην μόλυνση μίας επιφάνειας, μετά από οποιαδήποτε διαδικασία καταστροφής των μικροοργανισμών (π.χ. αποστείρωση, παστερίωση) σε αυτή, η οποία μπορεί να προκληθεί από την κακή υγιεινή των χειριστών των τροφίμων, από μολυσμένο εξοπλισμό, κλπ. Κατά την μικροβιακή μεταφορά οι μικροοργανισμοί ακολουθούν τρεις βασικές διαδρομές:

- i) από τον αέρα στο τρόφιμο (συνήθως σποριογόνοι παθογόνοι μικροοργανισμοί),
- ii) από τρόφιμο σε τρόφιμο (π.χ. από ωμό κρέας ή ψάρι σε λαχανικά),
- iii) από μια αβιοτική επιφάνεια σε ένα τρόφιμο, και το αντίστροφο (π.χ. από μολυσμένο μαχαίρι σε τρόφιμο μέσω της κοπής του, από μολυσμένα γάντια ή από επιφάνειες κοπής σε τρόφιμο μέσω της επαφής και το αντίστροφο).

Η διασταυρούμενη επιμόλυνση παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά παθογόνων βακτηρίων και στα φρέσκα λαχανικά, κατά το χειρισμό επιμολυσμένων τροφίμων, τόσο σε οικιακή κλίμακα και στα κέντρα μαζικής εστίασης, όσο και στην βιομηχανία. Για παράδειγμα, κατανάλωση μαρουλιών που επιμολύνθηκαν από ωμό κοτόπουλο οδήγησαν σε έξαρση καμπυλοβακτηρίωσης στην Οκλαχόμα το 1996 (Graves et al., 1998). Μία παρόμοια έξαρση από καμπυλοβακτήρια που βρίσκονταν

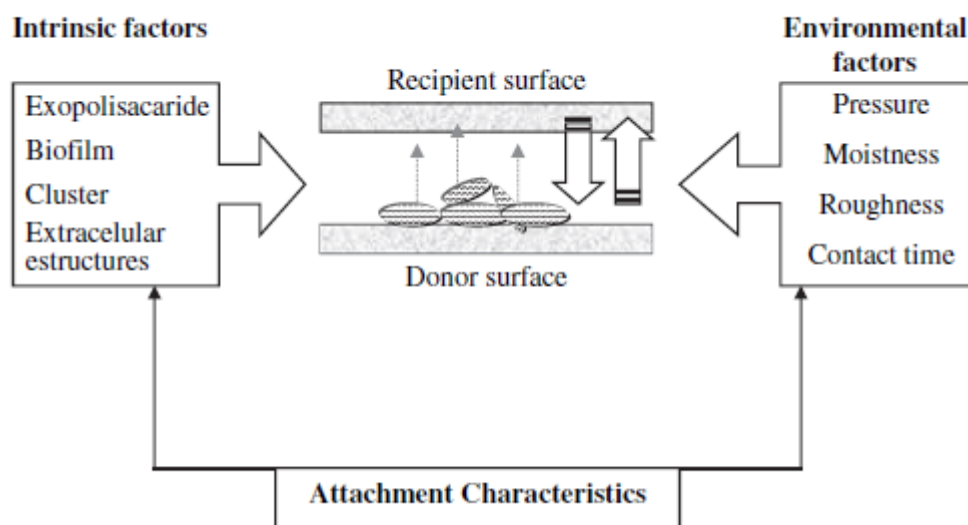
σε σάλτσα κοτόπουλου που επιμόλυναν μαρούλια παρουσιάστηκε στη Δανία το 2007 (Ravishankar et al., 2010). Διασταυρούμενη επιμόλυνση μαρουλιών με *E. coli* O157:H7 που μεταφέρθηκαν από ωμό μοσχαρίσιο κιμά προκάλεσαν τροφική δηλητηρίαση το 1995 (Mermin et al., 1996). Σε μία άλλη περίπτωση (Jackson et al., 2000), χειρισμός επιμολυσμένου με *E. coli* O157:H7 ωμού κρέατος που βρισκόταν σε κοντινή απόσταση με ωμά λαχανικά επιμόλυνε σαλάτες με αποτέλεσμα την εμφάνιση έξαρσης ασθένειας από *E. coli* O157:H7 σε χώρους μαζικής εστίασης το 1993.

Πολλοί ερευνητές έχουν προσδιορίσει ως πηγές επιμόλυνσης των φρέσκων λαχανικών το έδαφος, την κοπριά, το νερό άρδευσης, και τον κακό χειρισμό από τους ανθρώπους (Beuchat (1996), Bell (1997), Sofos (1994 και 2004)). Το σύστημα ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων του Ηνωμένου Βασιλείου έχει αναφέρει ότι η μικροβιακή μεταφορά είναι η κύρια αιτία που συνέβαλε (32%), στην πρόκληση των εξάρσεων δηλητηρίασης που σημειώθηκαν την χρονική περίοδο 1999-2000 (WHO, 2003). Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη μεταφορά παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα αποτελεί η χρήση εργαλείων κοπής και ο χειρισμός στο σπίτι (Ravishankar et al., 2010). Έρευνες που διεξήχθησαν έδειξαν ότι 25% από τις αναφερόμενες εξάρσεις, προκλήθηκαν από ακατάλληλο χειρισμό των τροφίμων στο σπίτι (Anderson et al., 2004). Άλλες επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν ότι στις ΗΠΑ, το Ηνωμένο Βασίλειο και την Αυστραλία, ένα σημαντικό μέρος των καταναλωτών ακολουθούν μη ορθή πρακτική κατά το χειρισμό των τροφίμων στο σπίτι (Redmond και Griffith, 2003) και ότι συχνά δεν ακολουθούν ασφαλείς πρακτικές για να αποφευχθούν επιμολύνσεις (Fischer et al., 2007).

Η μεταφορά μικροβίων στα τρόφιμα από διάφορα εργαλεία κοπής ή από επιφάνειες κοπής, κάτω από διαφορετικά σενάρια που μπορεί να επικρατήσουν στην κουζίνα, έχει απασχολήσει ερευνητές στο παρελθόν. Για παράδειγμα, οι Verhoeff-Bakkenes et al. (2008) διερεύνησαν διασταυρούμενη επιμόλυνση και μεταφορά του *C. jejuni* από ωμό κοτόπουλο μέσω των χεριών, εργαλείων κοπής και επιφανειών εργασίας και έδειξαν ότι το *C. jejuni* μεταφέρθηκε σε αγγούρια από μαχαίρι που είχε χρησιμοποιηθεί για τον τεμαχισμό κοτόπουλου. Οι Wachtel et al. (2003) μελέτησαν τη διασταυρούμενη επιμόλυνση του *E. coli* O157:H7 σε μαρούλι από μοσχαρίσιο κιμά. Είναι επομένως σαφές ότι τα κρούσματα βακτηριακών μολύνσεων είναι δυνατόν να αποφευχθούν εάν ληφθεί πρόνοια να πραγματοποιηθεί ασφαλής χειρισμός των τροφίμων στο σπίτι. Για αυτό το λόγο άλλωστε ο οργανισμός

τροφίμων και φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) εξέδωσε συστάσεις στους καταναλωτές που προετοιμάζουν το φαγητό στο σπίτι, για ορθή πρακτική και αποφυγή επιμολύνσεων, μέσω της καμπάνιας Fight BAC! (<http://www.fightbac.org>).

Η ικανότητα της μικροβιακής μεταφοράς συνδέεται με την βακτηριακή προσκόλληση. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την βακτηριακή μεταφορά, διακρίνονται σε δύο ομάδες, στους περιβαλλοντικούς και τους ενδογενείς (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της βακτηριακής μεταφοράς μεταξύ των επιφανειών. Περιλαμβάνονται οι περιβαλλοντικοί και ενδογενείς παράγοντες που διέπουν την βακτηριακή μεταφορά (Pérez Rodríguez, F., 2008).

Η πρώτη ομάδα αναφέρεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες του υλικού της επιφάνειας, στην υγρασία, στην πίεση που ασκείται, και στον χρόνο επαφής. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τους ενδογενείς παράγοντες των βακτηριακών ειδών όπως είναι η ικανότητα παραγωγής πολυσακχαριτών, ο σχηματισμός βιοϋμενίων και η παρουσία εξωκυτταρικών δομών.

Γνωρίζοντας λοιπόν, τους παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα της βακτηριακής μεταφοράς (π.χ. αυξημένη άσκηση πίεσης, αυξημένη υγρασία, μεγαλύτερος χρόνος επαφής κ.α), είναι δυνατόν, ακολουθώντας πρακτικές αποφυγής τους, να μειώσουμε τις εξάρσεις δηλητηριάσεων (Vorst et al, 2004).

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα βακτήρια που απαντώνται σε αβιοτικές επιφάνειες, θανατώνονται εξαιτίας του περιβαλλοντικού στρες που υπόκεινται (π.χ.

αφυδάτωση). Ο ρυθμός θανάτωσης εξαρτάται από τα βακτηριακά είδη και την φύση του περιβαλλοντικού στρες. Το γεγονός αυτό επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την βακτηριακή μεταφορά (Schaffner, 2004, Wilks, Michels, και Keevil, 2006). Για παράδειγμα εάν μία επιφάνεια είναι μολυσμένη με $3 \log \text{CFU/cm}^2$ και η μείωση του βακτηριακού φορτίου, λόγω περιβαλλοντικού στρες είναι $1 \log \text{CFU/cm}^2 \text{ h}$, τότε μετά από 3 ώρες δεν θα υπάρχουν βακτήρια στην επιφάνεια, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η βακτηριακή μεταφορά. Με άλλα λόγια, η επιβίωση των μικροοργανισμών καθορίζει εάν θα συμβεί βακτηριακή μεταφορά, αλλά και τον πληθυσμό των κυττάρων που θα μεταφερθούν (Christensen et al., 2005, Ivanek, Gronh, Wiedmann & Wells, 2004, Yang et al., 2006).

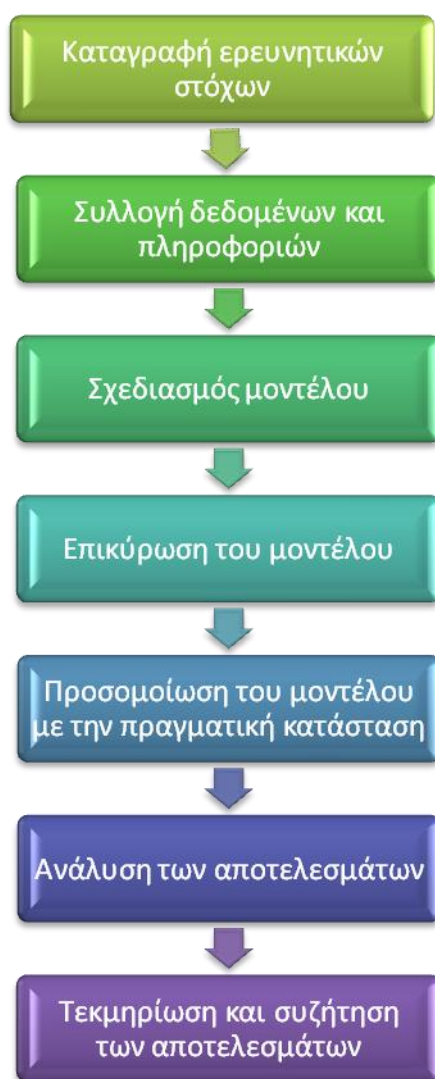
1.9 Μοντέλα Πρόβλεψης

Σήμερα, τα μοντέλα πρόβλεψης χρησιμοποιούνται σε πολλά εργαστήρια παγκοσμίως, προκειμένου να ερμηνεύσουν τα αποτελέσματα που προκύπτουν από διάφορες έρευνες. Στον τομέα της μικροβιολογίας χρησιμοποιούνται κινητικά μοντέλα πρόβλεψης (growth models), και μοντέλα μεταφοράς (transfer models). Ως επί τω πλείστον, τα κινητικά μοντέλα είναι περισσότερο ακριβή συγκριτικά με τα μοντέλα μεταφοράς (Pérez-Rodríguez F., et al., 2007). Σκοπός των μοντέλων μεταφοράς είναι να προβλέψουν πραγματικές καταστάσεις και να βοηθήσουν στην επιλογή αποτελεσματικών προληπτικών μέτρων μείωσης του κινδύνου εκδήλωσης τροφιμογενών ασθενειών, που οφείλονται στην βακτηριακή μεταφορά (διαδικασίες απολύμανσης, υγειονομικά μέτρα, πρόγραμμα δειγματοληψιών κτλ.) .

Ένα καλά σχεδιασμένο μοντέλο, είναι όσο το δυνατόν περισσότερο, κοντά στην πραγματική κατάσταση. Η μεγάλη αποχή του μοντέλου από τις πραγματικές τιμές, συνεπάγεται την ανεπαρκή «εκπαίδευσή» του, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένες αποφάσεις. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις, η αύξηση της εγκυρότητας του μοντέλου πάνω από ένα ορισμένο όριο δεν είναι ιδιαίτερα επιθυμητή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι προκειμένου να αυξηθεί η εγκυρότητα του μοντέλου θα πρέπει να «εκπαιδευτεί», όσο το δυνατόν καλύτερα, γεγονός το οποίο απαιτεί πληθώρα δεδομένων. Αυτό συνεπάγεται αυξημένο κόστος, χωρίς ωστόσο να εμφανίζεται μια σημαντικά καλύτερη εικόνα.

Τα βήματα που ακολουθούνται προκειμένου να σχεδιαστεί ένα μοντέλο παρουσιάζονται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (Σχήμα 1).

Σχήμα 1. Βήματα σχεδιασμού μοντέλου.



Πολύ σημαντικό κριτήριο για τον σχεδιασμό ενός μοντέλου πρόβλεψης, είναι να διατυπώνονται οι ερευνητικοί στόχοι. Σύμφωνα με αυτούς γίνεται η συλλογή δεδομένων και πληροφοριών, προκειμένου να γίνει μία όσο το δυνατόν καλύτερη «εκπαίδευση» του μοντέλου. Ακολουθεί η επικύρωση του μοντέλου και στην συνέχεια η προσομοίωσή του στις πραγματικές τιμές. Μετά την ανάλυση των

αποτελεσμάτων, ακολουθεί η συζήτησή τους και η στην συνέχεια η λήψη τυχόν αποφάσεων.

Διαφορετικά μαθηματικά μοντέλα που έχουν περιγράψει την συμπεριφορά των παθογόνων μικροοργανισμών κατά την επεξεργασία τροφίμων, έχουν μέχρι σήμερα προταθεί και δημοσιευθεί στην επιστημονική βιβλιογραφία. Τα εν λόγω μοντέλα έχουν αξιολογηθεί θετικά για την απόδοσή τους.

Ωστόσο τα περισσότερα από τα μοντέλα που έχουν προταθεί μέχρι σήμερα, είναι εμπειρικά και δεν μπορούν να ερμηνεύσουν τις παραμέτρους του μοντέλου. Ως εκ τούτου, εξακολουθεί να είναι σημαντική, η ανάπτυξη μοντέλων τα οποία δεν θα είναι ικανά μόνο να περιγράφουν την παρατηρούμενη διασταυρούμενη επιμόλυνση, λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος της μόλυνσης καθ' όλη την διάρκεια της προετοιμασίας των τροφίμων, αλλά να δίνουν και μία λογική εξήγηση για την μεταφορά των παθογόνων μικροοργανισμών σε αυτά (transfer models).

ΣΚΟΠΟΣ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πολλοί ερευνητές έχουν συλλέξει στοιχεία για τη μεταφορά βακτηρίων από επιφάνειες και εργαλεία κοπής σε τρόφιμα. Επιπλέον, έχουν γίνει προσπάθειες να γίνει ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με σκοπό τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης για τη μεταφορά βακτηρίων κάτω από διαφορετικά σενάρια/χειρισμούς στην κουζίνα. Για παράδειγμα, έχει διερευνηθεί και μοντελοποιηθεί η μεταφορά *Enterobacter* spp. και *Salmonella* spp. από επιφάνειες κοπής σε μαρούλια (Zhao et al. 1998), όπως επίσης και η μεταφορά *Listeria monocytogenes* κατά την κοπή/τεμαχισμό προϊόντων κρέατος σε συνδυασμό με τον καθαρισμό των εργαλείων/επιφανειών κοπής (Hoelzer et al. 2012). Έχει επιπλέον μελετηθεί ο ρυθμός μεταφοράς του βακτηρίου *Salmonella* spp. από μολυσμένα μαχαίρια κοπής σε μαρούλι (Ravishankar et al. 2010), ο ρυθμός μεταφοράς από μολυσμένες επιφάνειες και εργαλεία κοπής *Campylobacter jejuni* και *Lactobacillus casei* σε μαρούλι (Van Asselt et al. 2008), όπως επίσης και η μεταφορά *Campylobacter* spp. σε διαφορετικά προϊόντα (Luber et al. 2006). Τέλος, έχει εξεταστεί και η φυσιολογική κατάσταση/ιδιότητες του εμβολίου (υψηλό/χαμηλό εμβόλιο, υψηλής/χαμηλής ικανότητας για δημιουργία βιουμενίων) κατά την κοπή διαφόρων προϊόντων κρέατος με μαχαίρια κουζίνας (Vorst et al. 2006a). Είναι σαφές επομένως ότι παρουσιάζει αρκετό πρακτικό και επιστημονικό ενδιαφέρον η ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου για τον ποσοτικό υπολογισμό της μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών.

Στην παρούσα εργασία, αρχικά ποσοτικοποιήθηκε η μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών από σκεύη κοπής λαχανικών προς πράσινα φυλλώδη λαχανικά και το αντίστροφο. Στη συνέχεια μελετήθηκαν παράγοντες όπως το είδος του μικροοργανισμού (*E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes*), η έκταση της μόλυνσης (10^5 ή 10^3 log CFU/g), η φυσιολογική κατάσταση του εμβολίου (φρέσκο-0 ημέρα ή παλαιό-4 ημέρες), το είδος της φυλλικής επιφάνειας (λάχανο-μαρούλι), και διαφορετικά σκεύη κοπής (μαχαίρι και αυτόματη συσκευή τεμαχισμού λαχανικών), προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδρασή τους στην μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από και προς τα λαχανικά, κάτω από διαφορετικά σενάρια επιμολύνσεων. Απώτερος σκοπός των παραπάνω ήταν η δημιουργία ενός μαθηματικού μοντέλου, το οποίο θα

έχει την δυνατότητα να προβλέπει την μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών από μολυσμένα σκεύη κοπής σε λαχανικά, κατά την προετοιμασία τους.

Έτσι λοιπόν, οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν: α) ο καθορισμός της κατανομής του ρυθμού μεταφοράς των μικροοργανισμών *Escherichia coli* O157:H7 και *Listeria monocytogenes* μεταξύ φύλλων μαρουλιού και μαχαιριών κοπής τους, και β) η μοντελοποίηση της βακτηριακής μεταφοράς από σκεύη κοπής σε φρεσκοκομμένες σαλάτες, και το αντίστροφο, κατά την διαδικασία διαδοχικών κοπών πράσινων φυλλωδών λαχανικών, κάτω από διαφορετικά σενάρια χειρισμού και διασταυρούμενης επιμόλυνσης, προσομοιάζοντας έτσι την παρεμβολή μολυσμένων παρτίδων λαχανικών κατά την προετοιμασία φρέσκων σαλατών.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία εμβολίου

A) Ανανέωση εμβολίου

Η ανανέωση του εμβολίου έγινε με σκοπό να ανακτήσουν τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού την ζωτικότητα τους και να καταστούν έτοιμα για ανάπτυξη. Δύο ημέρες πριν το πείραμα, έγινε η πρώτη ανανέωση τριών στελεχών του παθογόνου βακτηρίου *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12079, NCTC 13125, NCTC 13127) ή τριών του *Listeria monocytogenes* (4b, 1/2a, 4b). Κατά την ανανέωση, απομονώθηκε μία αποικία από κάθε στέλεχος και τοποθετήθηκε σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες η καθεμία, που περιείχαν 10 ml θρεπτικού διαλύματος Tryptic Soy Broth (TSB, LabM, UK) για το *E. Coli* O157:H7 ή TSB εμπλουτισμένο με 0,6% Yeast Extract (TSBYE, LabM, UK) για το *L. monocytogenes*. Ακολούθησε ανάδευση της αποικίας και στην συνέχεια επώασή της για 24 h, στους 37°C (*E. coli* O157:H7) ή στους 30°C (*L. monocytogenes*). Μετά το πέρας των 24 ωρών, έγινε η δεύτερη ανανέωση, κατά την οποία μεταφέρθηκαν 100 μl από το θολωμένο διάλυμα κάθε στελέχους σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 ml TSB ή TSBYE, και εν συνεχεία ακολούθησε επώαση στους 37°C (*E. coli* O157:H7) ή στους 30°C (*L. monocytogenes*), για 18 h.

B) Καθαρισμός εμβολίου

Μετά το πέρας των 18 ωρών έγινε ο καθαρισμός των κυττάρων των στελεχών των παθογόνων βακτηρίων. Σκοπός του καθαρισμού των κυττάρων, ήταν να γίνει η απομάκρυνση τυχόν μεταβολικών προϊόντων που μπορεί να παρήχθησαν κατά την στατική φάση του ρυθμού ανάπτυξής τους, καθώς και η απομάκρυνση του θρεπτικού υποστρώματος. Κατά τον καθαρισμό του εμβολίου, αρχικά έγινε η μεταφορά του TSB, στο οποίο βρίσκονταν τα ανεπτυγμένα κύτταρα, από τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρισης. Στη συνέχεια, οι πλαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν, αντιδιαμετρικά, στην φυγόκεντρο, προκειμένου να φυγοκεντρηθούν στις 3600 rpm για 15 min, στους 4°C. Μετά την λήξη των 15 λεπτών, ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκειμένου και έκπλυση των κυττάρων με 10 ml Ringer. Η

παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές. Στο τελικό στάδιο καθαρισμού του εμβολίου, έγινε επαναιώρηση των κυττάρων, του κάθε στελέχους του μικροοργανισμού με 10 ml Ringer, και κατόπιν ανάμιξη αυτών. Έτσι, δημιουργήθηκε ένα μίγμα τριών στελεχών (cocktail) του παθογόνου μικροοργανισμού. Όπου κρίθηκε απαραίτητο ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις προκειμένου να αποκτηθεί το επιθυμητό τελικό επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού. Σε μία λεκάνη με 2 l Ringer, προστέθηκε το μίγμα των στελεχών του μικροοργανισμού. Για τον προσδιορισμό του αρχικού μικροβιακού φορτίου, λήφθηκε με πιπέτα 1 ml από το μίγμα του μικροοργανισμού (*L. monocytogenes* ή *E. coli* O157:H7) και ακολούθησε μικροβιολογική ανάλυση όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.7.1.

2.2 Προετοιμασία και εμβολιασμός των μαρουλιών

Φρέσκα μαρούλια αγοράστηκαν από τοπική επιχείρηση λιανικής πώλησης. Αφαιρέθηκαν τα εξωτερικά τους φύλλα προς απόρριψη, και εν συνέχεια, έγινε σχολαστικός καθαρισμός των υπόλοιπων φύλλων, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν

υπολείμματα

χώματος. Αφού

έγινε η επιλογή

μιας δέσμης 10

ισομεγεθών

φύλλων

μαρουλιού

(παρτίδα),

ακολούθησε ο

εμβολιασμός της, **Εικόνα 7** Εμβολιασμός παρτίδων φύλλων μαρουλιών

με το cocktail των

τριών στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού (*E. coli* O157:H7 ή *L.*

monocytogenes). Ο εμβολιασμός έγινε με εμβάπτιση της δέσμης των φύλλων στην

λεκάνη με το εμβόλιο (10^6 ή 10^4 log CFU/g), για 1 min. Μετά το πέρας του χρόνου

αυτού, έγινε αποστράγγιση της δέσμης των φύλλων. Ακολούθησε τοποθέτησή της σε



σακούλες πολυαιθυλενίου και παραμονή της, στους 4°C για 1 h, προκειμένου να γίνει η προσκόλληση των κυττάρων του βακτηρίου στο λαχανικό (attachment). Μετά το πέρας της 1 ώρας, έγινε φυγοκέντριση της δέσμης των φύλλων σε οικιακή φυγόκεντρο (20 περιστροφές του πλαστικού μοχλού, με σταθερή ταχύτητα) προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια εμβολίου. Τέλος, έγινε δειγματοληψία των φύλλων μαρουλιού προς έλεγχο του μικροβιακού τους φορτίου. Ακολούθως, οι δέσμες



των φύλλων μαρουλιού, χρησιμοποιήθηκαν είτε απευθείας (πείραματα 1, 2 και 3), είτε τοποθετήθηκαν σε σακούλες πολυαιθυλενίου στους 4°C για 4 ημέρες, με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της παλαιότητας του εμβολίου στην μεταφορά του (πείραματα 1 και 2).

Εικόνα 8 Συσκευή απομάκρυνσης της περίσσειας εμβολίου από τα λαχανικά

2.3 Προετοιμασία μαχαιριών

Τα μαχαίρια που επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν στην συγκεκριμένη μελέτη, προκειμένου να γίνει η κοπή λαχανικών, ώστε να μελετηθεί η ποσοτική μεταφορά των μικροβιακών κυττάρων είναι διαστάσεων: μήκος: 15 cm, πλάτος: 2,8 cm. Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο μέγεθος μαχαιριών, διότι από προηγούμενες μελέτες που έχουν λάβει χώρα στο



Εικόνα 9 Μαχαίρι που χρησιμοποιήθηκε για την κοπή λαχανικών

εργαστήριο του Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, διαπιστώθηκε ότι το συγκεκριμένο μέγεθος μαχαιριού έδινε μικρή διακύμανση στην μεταφορά μικροβιακών κυττάρων και μικρές τυπικές αποκλίσεις. Επιπλέον, μικρότερου μεγέθους μαχαίρια, μπορούσαν να κόψουν μοναδιαία φύλλα μαρουλιού, γεγονός το οποίο αφενός δεν είναι αντιπροσωπευτικό της πραγματικότητας, αφετέρου δεν μπορεί να δώσει μια σαφή εικόνα της μεταφοράς μικροβιακών κυττάρων. Πριν την χρήση

τους τα μαχαίρια αποστειρώθηκαν στους 128°C, για 28 min. Στην συνέχεια, πριν από οποιαδήποτε χρήση τους, τα μαχαίρια απολυμαίνονταν με αλκοόλη 100% (v/v) και φλόγα.

2.4 Ποσοτικοποίηση της μεταφοράς των παθογόνων μικροοργανισμών *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7

2.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός της μεταφορά των *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7 από εμβολιασμένο μαρούλι σε στείρο μαχαίρι ύστερα από μια κοπή

Παρτίδες φύλλων μαρουλιού (10^5 ή 10^3 log CFU/g), τοποθετήθηκαν σε στείρα επιφάνεια κοπής. 10 ισομεγέθη φύλλα (παρτίδα) τοποθετήθηκαν το ένα πάνω στο άλλο, προκειμένου να πραγματοποιηθούν σε αυτά 100 μονές κοπές. Χρησιμοποιήθηκαν 100 στείρα μαχαίρια προκειμένου να γίνουν οι 100 μονές κοπές (ένα μαχαίρι για κάθε κοπή). Κατά τις κοπές ασκήθηκε, κατά το δυνατόν, σταθερή δύναμη και πραγματοποιήθηκαν ίδιες κινήσεις. Ακολούθησε δειγματοληψία στο μαχαίρι για τον ποσοτικό έλεγχο της μεταφοράς του παθογόνου σε αυτό, η οποία έγινε με βαμβακοφόρο στυλεό (μπατονέτα - cotton swab) ως εξής: αρχικά η μπατονέτα εμβαπτίστηκε στον δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε αραιωτικό Ringer, και εν συνεχεία, με σταθερής έντασης κινήσεις, η μπατονέτα διήλθε επαπτόμενη, κατά μήκος όλης της επιφάνειας του μαχαιριού, 9 φορές από την κάθε πλευρά του. Η πίεση που ασκήθηκε στην μπατονέτα, ήταν κατά το δυνατόν, σταθερή. Ακολούθως, κάθε μπατονέτα τοποθετήθηκε σε διαφορετικό κάθε φορά δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 10 ml αραιωτικού διαλύματος Ringer. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις που ακολούθησαν προκειμένου να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων που συλλέχθηκαν από το μαχαίρι περιγράφονται στην 2.7.1.

2.4.2 Μεταφορά των *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7 από επιμολυσμένο μαχαίρι σε ανευβολίαστο μαρούλι ύστερα από μια κοπή

Στο συγκεκριμένο πείραμα, μελετήθηκε η μεταφορά των κυττάρων *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7 από μολυσμένο μαχαίρι κοπής σε ενεμβολίαστο μαρούλι, ύστερα από μια κοπή. Τα μαχαίρια που χρησιμοποιήθηκαν επιμολύνθηκαν

προηγούμενως, με κοπή σε εμβολιασμένη παρτίδα (10^5 ή 10^3 log CFU/g) φύλλων μαρουλιού. Κάθε ένα από τα 100 επιμολυσμένα μαχαίρια που χρησιμοποιήθηκαν, πραγματοποίησε μια κοπή (ένα μαχαίρι για κάθε κοπή). Οι 100 μονές κοπές έγιναν σε παρτίδες φύλλων μαρουλιού, τοποθετημένων το ένα πάνω στο άλλο, και σε στείρα επιφάνεια κοπής. Για τον έλεγχο της μεταφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού, από το μολυσμένο μαχαίρι στο λαχανικό, έγινε δειγματοληψία κάθε φορά του τμήματος του λαχανικού που ήρθε σε επαφή με την επιφάνεια του μολυσμένου μαχαιριού, μετά από κάθε μονή κοπή. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με εγκάρσια κοπή του υπό εξέταση τμήματος του λαχανικού με αποστειρωμένο μαχαίρι και συλλογή του δείγματος με αποστειρωμένη λαβίδα. Ακολούθησε τοποθέτηση του δείγματος σε αποστειρωμένες σακούλες stomacher. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις που ακολούθησαν προκειμένου να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων που μεταφέρθηκαν στο λαχανικό περιγράφονται στην 2.7.1.

2.4.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της μεταφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού από επιμολυσμένο μαχαίρι σε ανεμβολίαστο μαρούλι, μετά από μία σειρά διαδοχικών κοπών.

Μαχαίρι το οποίο επιμολύνθηκε με *L. monocytogenes* ή *E. coli* O157:H7 κατόπιν κοπής σε εμβολιασμένη παρτίδα (10^5 ή 10^3 log CFU/g) φύλλων μαρουλιού, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να πραγματοποιηθούν διαδοχικές κοπές σε ανεμβολίαστες παρτίδες φύλλων μαρουλιού.

Προκειμένου να διαπιστωθεί το μικροβιακό φορτίο, ύστερα από κάθε κοπή, έγινε δειγματοληψία τόσο στο μαχαίρι (όπως περιγράφεται στο πείραμα 1), όσο και στο τμήμα του μαρουλιού που ήρθε σε επαφή με την επιφάνεια του μαχαιριού κατά την κοπή του (όπως στο πείραμα 2). Πραγματοποιήθηκαν 4 επαναλήψεις του ίδιου πειράματος. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις που ακολούθησαν προκειμένου να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων που μεταφέρθηκαν στο λαχανικό περιγράφονται στην 2.7.1.

2.5 Ανάπτυξη του μοντέλου

Το μοντέλο που προτάθηκε στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την μεταφορά των κυττάρων του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes* σε φρέσκο λαχανικό κατά την κοπή του από μολυσμένο μαχαίρι, βασίστηκε στο μοντέλο που πρότειναν οι *Møller et al.* (2012), για να προβλέψουν την μεταφορά (log CFU/g) του μικροοργανισμού *Salmonella* Typhimurium DT104, κατά τον τεμαχισμό χοιρινού κρέατος. Για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μοντέλου έγινε η υπόθεση της ύπαρξης δύο υποπεριβάλλοντων στο μαχαίρι. Το πρώτο περιγράφει μία γρήγορη μεταφορά των μικροβιακών κυττάρων λόγω χαλαρής προσκόλλησης στο μαχαίρι και το δεύτερο περιγράφει μία πιο αργή μεταφορά που οφείλεται στην ισχυρή προσκόλληση των κυττάρων του μικροοργανισμού στο μαχαίρι.

Βασιζόμενοι σε αυτή την υπόθεση, εφαρμόστηκε ένα μοντέλο με παραμέτρους που περιγράφουν το σύνολο της μικροβιακής μεταφοράς όπως περιγράφεται στις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\begin{cases} M_i = (1-a_1)(1-a_2)(1-c_2)S_i + (b_1 gr_{1,i-1}) + (b_2 gr_{2,i-1}) \\ gr_{1,i} = a_1 S_i + (1-b_1)(1-c_1) gr_{1,i-1} \\ gr_{2,i} = a_2 S_i + (1-b_2)(1-c_3) gr_{2,i-1} \end{cases}$$

Το μοντέλο αυτό, έχει επτά παραμέτρους (a_1 , a_2 , b_1 , b_2 , c_1 , c_2 , c_3) αλλά οι δύο εξ' αυτών (c_1 , c_2) έχουν μηδενική τιμή καθώς δεν υφίστανται φαινόμενα αδρανοποίησης των μικροοργανισμών είτε στο λαχανικό (που αποτελεί ευνοϊκό υπόστρωμα για την προσκόλλησή τους) είτε στο περιβάλλον 1 (E1).

Πίνακας 3. Παράμετροι μοντέλου

a1: Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το περιβάλλον 1 του μαχαιριού στο λαχανικό

a2: Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το περιβάλλον 1 του μαχαιριού στο λαχανικό

b1: Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το περιβάλλον 1 του μαχαιριού στο λαχανικό

b2: Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το περιβάλλον 1 του μαχαιριού στο λαχανικό

c3: Μειωμένη μεταφορά λόγω θανάτωσης ή μη αποκόλλησης των κυττάρων

Οι τιμές των παραμέτρων κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 0 και 1.

Για τον υπολογισμό των εξισώσεων, θεωρήθηκε ότι υπάρχουν k δείγματα λαχανικού που προκύπτουν ύστερα από κοπή ($i=1,2,\dots,k$). Το i δείγμα λαχανικού φέρει S_i κύτταρα *E. coli* O157:H7 ή *L. monocytogenes*. Μετά την i κοπή, το λαχανικό φέρει ένα μικροβιακό φορτίο M_i . Η κατάσταση του μαχαιριού μετά από κάθε κοπή περιγράφεται ως gr_i .

Για την εκτίμηση των παραμέτρων υπολογίστηκε ο συντελεστής **Residual Sum of Squares (RSS)** μεταξύ των πραγματικών και των προβλεπόμενων τιμών, ο οποίος ελαχιστοποιήθηκε με την χρήση της εφαρμογής «Solver» του MS Excel. Επιπλέον υπολογίστηκε ο συντελεστής **Root Mean sum of Squared Errors (RMSE)**.

2.6 Συλλογή δεδομένων για την επικύρωση του μοντέλου

Προκειμένου να γίνει η επικύρωση και η αξιολόγηση της επίδοσης του μοντέλου που θα προβλέπει την μεταφορά των κυττάρων των παθογόνων μικροοργανισμών *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes* από επιμολυσμένο μαχαίρι (η επιμόλυνση έγινε όπως περιγράφεται στο πείραμα 1) σε λαχανικό, κατά την διαδικασία διαδοχικών κοπών ανεμβολίαστων παρτίδων φύλλων μαρουλιού παρεμβλήθηκαν, σε συγκεκριμένα σημεία, (πίνακας 3), κοπές σε μολυσμένων παρτίδες μαρουλιού (10^5 ή 10^3 log CFU/g).

Πίνακας 4. Αριθμός κοπής που έγινε η παρεμβολή με εμβολιασμένο λαχανικό.

Κοπές	Πληθυσμός παθογόνου στην παρεμβαλλόμενη μολυσμένη παρτίδα
<i>E. coli</i> O157:H7	
9	10^5 log CFU/g
9	10^3 log CFU/g
23	10^5 log CFU/g
23	10^3 log CFU/g
9 και 32	10^5 log CFU/g
9 και 16	10^3 log CFU/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	
9	10^5 log CFU/g
9	10^3 log CFU/g
19	10^5 log CFU/g
19	10^3 log CFU/g
9 και 32	10^5 log CFU/g
9 και 16	10^3 log CFU/g

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί το μικροβιακό φορτίο, ύστερα από κάθε κοπή, έγινε δειγματοληψία τόσο στο μαχαίρι (όπως περιγράφεται στο πείραμα 1), όσο και στο τμήμα του μαρουλιού που ήρθε σε επαφή με τις επιφάνειες του μαχαιριού κατά την κοπή του (όπως στο πείραμα 2). Οι μικροβιολογικές αναλύσεις που ακολούθησαν προκειμένου να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων που μεταφέρθηκαν στο λαχανικό περιγράφονται στην 2.7.1.

Επιπλέον, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδοση του μοντέλου, έγινε η κοπή λάχανου σε αυτοματοποιημένη συσκευή τεμαχισμού|λαχανικών. Αρχικά, αγοράστηκε

λάχανο από τοπική επιχείρηση λιανικής πώλησης. Αφαιρέθηκαν τα εξωτερικά φύλλα του λάχανου προς απόρριψη, και το υπόλοιπο πλύθηκε σχολαστικά. Εμβολιάστηκαν 120 g λάχανου με εμβάπτιση για 1 min, σε λεκάνη που περιείχε cocktail των τριών στελεχών του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* ή του *E. coli* O157:H7 και εν συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε σακούλες πολυαιθυλενίου, υπό ασηπτικές συνθήκες.



Εικόνα 10 Αριστερά: Παρτίδες λάχανου (30 g). Δεξιά: Τεμαχισμός των παρτίδων λάχανου στην αυτόματη συσκευή τεμαχισμού λαχανικών.

Οι σακούλες τοποθετήθηκαν στους 4°C, για 1 h, προκειμένου να γίνει η προσκόλληση των κυττάρων του μικροοργανισμού στο λαχανικό. Μετά το πέρας της 1 ώρας, το εμβολιασμένο λάχανο τεμαχίστηκε στην αυτόματη συσκευή κοπής, προκαλώντας διασταυρούμενη επιμόλυνση. Το υπόλοιπο λάχανο κόπηκε σε παρτίδες των 30 g οι οποίες τεμαχίζονταν διαδοχικά (Εικόνα 10).

Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδοση του μοντέλου, υπολογίστηκαν οι συντελεστές **Bias factor (Bf)** και **Accuracy factor (Af)** (Ross 1996). Οι εν λόγω συντελεστές καθορίζουν την συμφωνία των προβλεπόμενων τιμών του μοντέλου με τις πραγματικές τιμές. Οι τιμές των συντελεστών δείχνουν αυξημένη προσομοίωση των προβλεπόμενων τιμών στις πραγματικές, όταν τείνουν στο 1.

2.7 Μικροβιολογική Ανάλυση

2.7.1 Ποσοτικός προσδιορισμός της μικροβιακής μεταφοράς κατά τις κοπές

Για να εκτιμηθεί ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων των παθογόνων μικροοργανισμών που μεταφέρθηκαν από το μολυσμένο μαχαίρι ή την συσκευή αυτόματης κοπής λαχανικών στο ανεμβολίαστο μαρούλι ή λάχανο, αντίστοιχα, κατά την κοπή τους, τοποθετήθηκαν τα δείγματα σε σακούλες stomacher, οι οποίες συμπληρώθηκαν με αραιωτικό διάλυμα Ringer σε αναλογία 10 ή 5 : 1 (βάρος αραιωτικού:βάρος δείγματος). Ακολούθησε ομογενοποίηση του δείγματος, για 1 min, στην συσκευή ομογενοποίησης (Seward Stomacher-400 Colworth House, England). Όποτε κρίθηκε απαραίτητο ακολουθήθηκε η μέθοδος των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Επιλέχθηκε η κατάλληλη αραιώση προκειμένου να ληφθεί ποσότητα 100 μl ή 1 ml και να πραγματοποιηθεί επιφανειακή επίστρωσή της, σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υλικό, προκειμένου να καλλιεργηθούν και καταμετρηθούν οι βακτηριακές αποικίες.

Προκειμένου να γίνει καταμέτρηση του πληθυσμού των κυττάρων των μικροοργανισμών που μεταφέρθηκαν από το μολυσμένο μαρούλι στο μαχαίρι, έγινε ανάδευση της μπατονέτας που ήταν εμβαπτισμένη σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml αραιωτικού διαλύματος Ringer, για 10 sec, στην συσκευή αναδέυσεως (Vortex – Biomax). Ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, όπου κρίθηκε απαραίτητο, και αφού επιλέχθηκε η κατάλληλη αραιώση, λήφθηκε ποσότητα 100 μl ή 1 ml και πραγματοποιήθηκε επιφανειακή επίστρωσή της, σε τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υλικό.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση του *E. coli* O157:H7, ήταν το **Sorbitol MacConkey Agar (SMAC)** (Oxoid, UK), στο οποίο προστέθηκε αντιβιοτικό **Cefixime Tellurite** (Oxoid, UK), προκειμένου να καταστήσει το υλικό επιλεκτικό. Η επώαση έγινε στους 37°C, για 24 h.

Το θρεπτικό υλικό στο οποίο έγινε η καταμέτρηση του βακτηρίου *L. monocytogenes*, ήταν το **Agar Listeria Ottavani & Agosti (ALOA)** (Oxoid, UK), στο οποίο προστέθηκε **OCLA (ISO) Selective Supplement** (Oxoid, UK) και **OCLA (ISO) Differential Supplement** (Oxoid, UK). Η επώαση έγινε στους 37°C, για 48 h.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία ή απουσία του παθογόνου, στις περιπτώσεις που τα επίπεδα του πληθυσμού των βακτηριακών κυττάρων ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου (μαχαίρι: 1 log CFU/g, μαρούλι: 0,7 log CFU/g), πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός. Έτσι στην περίπτωση του υψηλού εμβολίου (10^5), μετά την 25η και μέχρι την 30η πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και όχι καταμέτρηση του παθογόνου μικροοργανισμού. Ο εμπλουτισμός έγινε τόσο στο δείγμα του λαχανικού, όσο και στην μπατονέτα, που χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η δειγματοληψία του μαχαιριού. Στην περίπτωση του χαμηλού εμβολίου (10^3), έγινε εμπλουτισμός στις κοπές 9, 10.

Το μέσο εμπλουτισμού που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 ήταν το **Modified TSB** (Biolife, Italy), στο οποίο προστέθηκε το αντιβιοτικό **Novobiocin** (Biolife, Italy). Τα δείγματα επώαστηκαν στο εμπλουτιστικό για 18 h, στους 41°C. Προκειμένου να ελεγχθεί η παρουσία κυττάρων του παθογόνου βακτηρίου, έγινε επιφανειακή γραμμική επίστρωση (streaking) 100 μl δείγματος σε τρυβλία με SMAC, και επώαστηκαν στους 37°C, για 24 h.

Ο εμπλουτισμός του δείγματος, προκειμένου να γίνει η ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes*, έγινε αρχικά με **Half Fraser** (LabM, UK), στο οποίο προστέθηκε Ferric Ammonium Citrate Supplement (LabM, UK). Η επώαση έγινε στους 30°C, για 24 h. Στην συνέχεια, μεταφέραμε 100μl από το Half Fraser σε **Full Fraser** (LabM, UK). Η επώαση έγινε για 24 h, στους 30°C. Για τον έλεγχο της παρουσίας του παθογόνου βακτηρίου, έγινε επιφανειακή γραμμική επίστρωση (streaking) από το εμπλουτισμένο δείγμα, σε τρυβλία με ALOA και επώαστηκαν στους 37°C, για 48 h.

2.8 Στατιστική Ανάλυση Δεδομένων

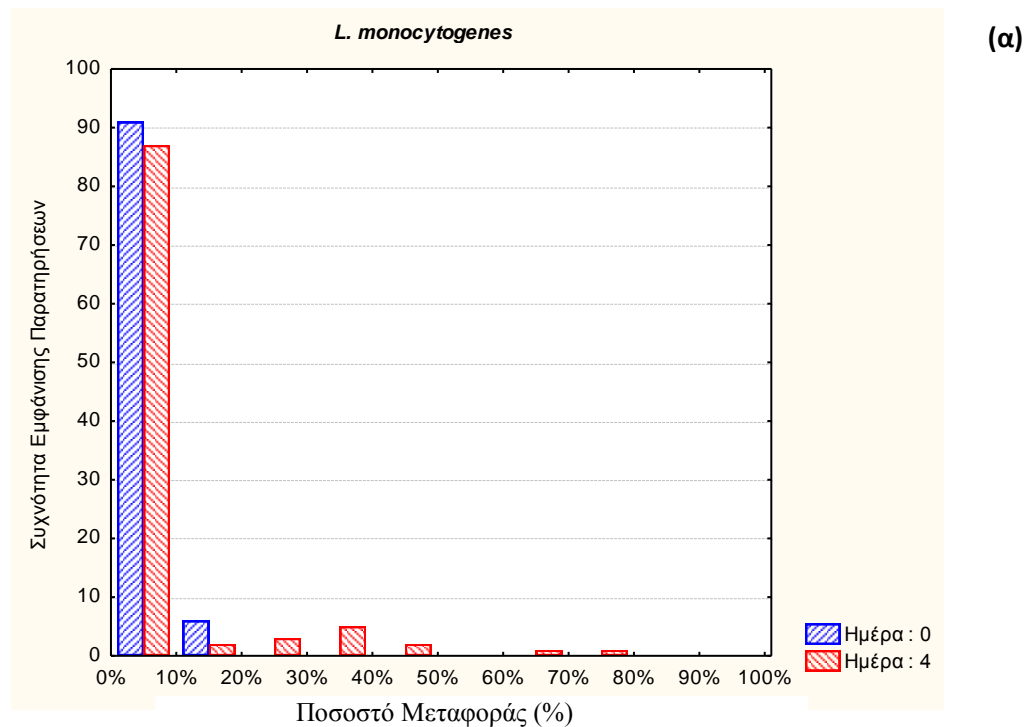
Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα STATISTICA10 Trial. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και η διακύμανση της μικροβιακής μεταφοράς. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές σε επίπεδο 95% ($p < 0,05$).

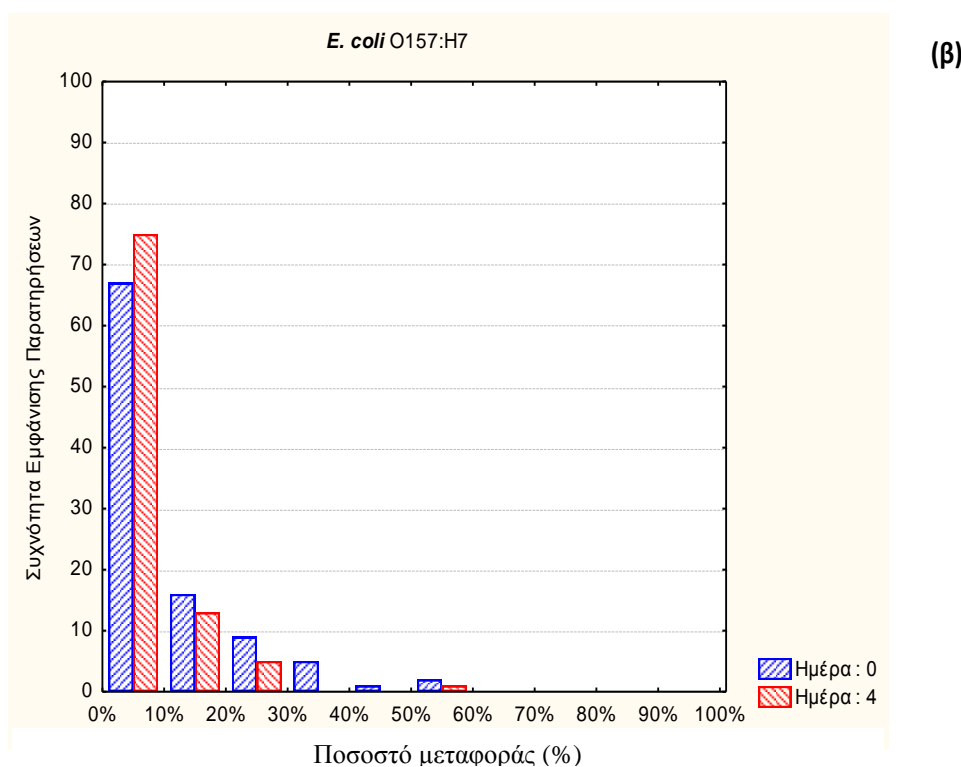
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Ποσοτική μεταφορά των μικροοργανισμών *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7 κατά τις μονές κοπές

Αρχικά υπήρξε η επιδίωξη να μελετηθεί το ποσοστό μεταφοράς των κυττάρων των μικροοργανισμών *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7, από επιμολυσμένο μαχαίρι σε ανεμβολίαστο μαρούλι και το αντίστροφο. Έτσι, έγιναν μονές κοπές με στείρο μαχαίρι σε εμβολιασμένο μαρούλι, προκειμένου να μελετηθεί το ποσοστό της κυτταρικής μεταφοράς από το μαρούλι στο μαχαίρι. Το ποσοστό μεταφοράς απεικονίζεται στα παρακάτω ιστογράμματα (Γραφήματα 2 α, β).





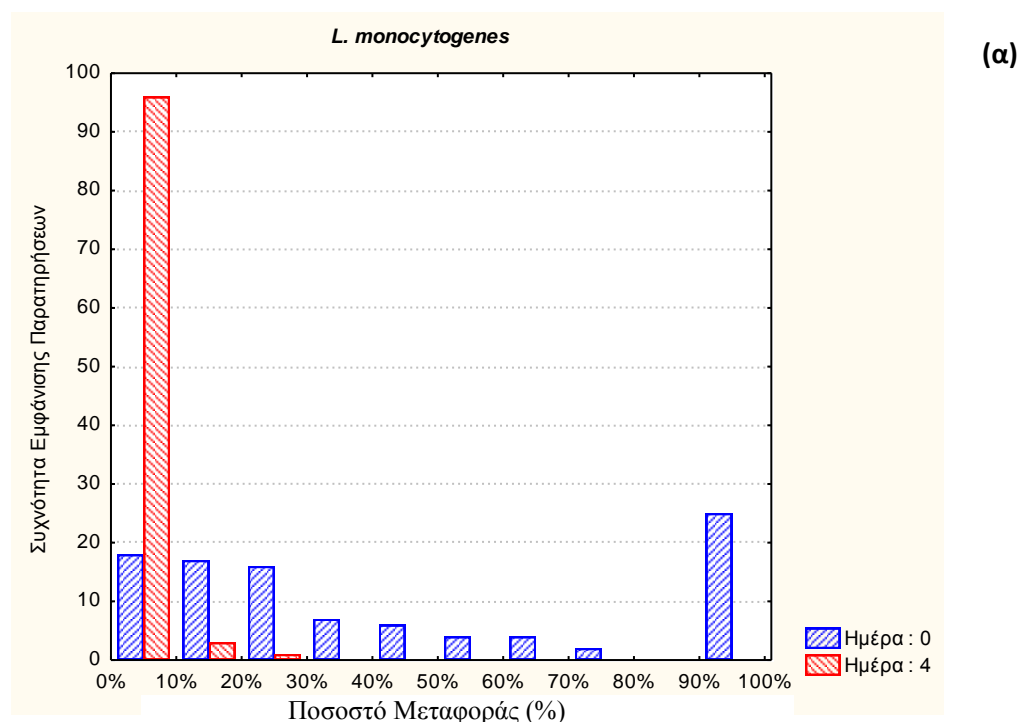
Γραφήματα 2 α, β. Ιστόγραμμα κατανομής ποσοστού μεταφοράς του α) *L. monocytogenes* και β) *E. coli* O157:H7 από μολυσμένο μαρούλι σε στείρο μαχαίρι (100 μονές κοπές) τις ημέρες 0 και 4

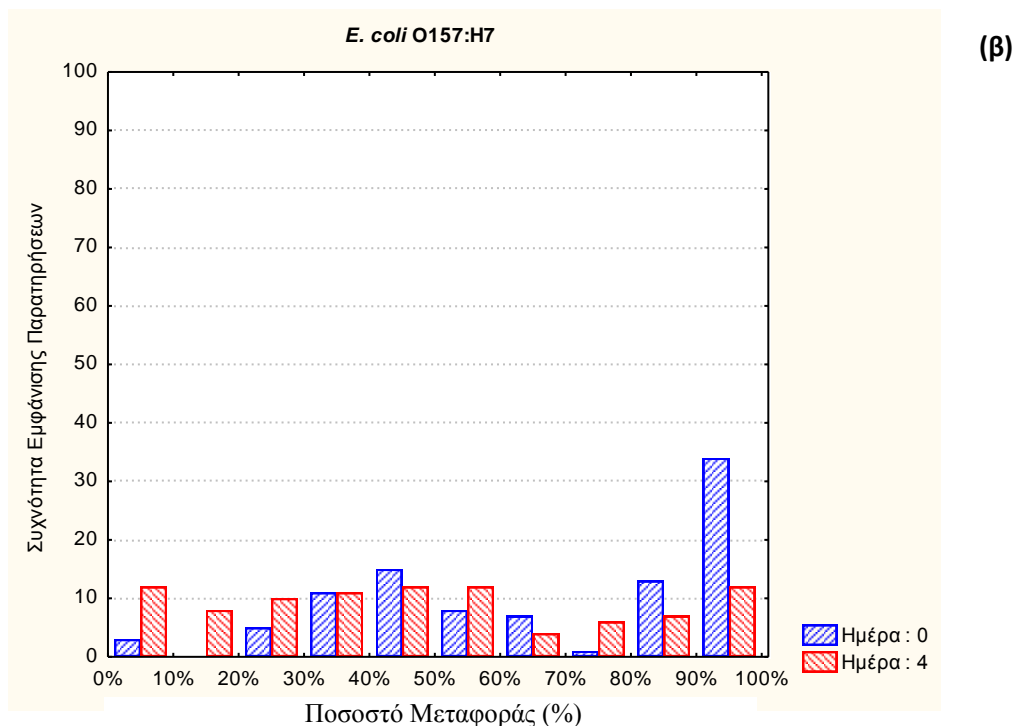
Στα γραφήματα 2 α, β παρατηρείται η κατανομή του ποσοστού μεταφοράς των κυττάρων α) του *L. monocytogenes* και β) του *E. coli* O157:H7 από μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού σε στείρο μαχαίρι μεταξύ 100 μονών κοπών που πραγματοποιήθηκαν (100 επαναλήψεις). Το ποσοστό μεταφοράς υπολογίστηκε ως **αριθμός κυττάρων (CFU) στο μαχαίρι / (CFU) στο μαρούλι * %**. Όπως διαπιστώνεται η κατανομή είναι αριστερά μετατοπισμένη και για τους δυο μικροοργανισμούς γεγονός που δείχνει ένα σταθερά χαμηλό ποσοστό του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων που βρίσκονται στο μαρούλι να μετακινείται στο μαχαίρι. Την μηδενική ημέρα το 65% περίπου των παρατηρήσεων για το *E. coli* O157:H7 συγκεντρώθηκε σε τιμές από 0,1 – 10% και το 15% των παρατηρήσεων αντιπροσωπεύεται από μετρήσεις μεταξύ 10 – 20%. Οι υπόλοιπες παρατηρήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ του 20 – 53%. Αντίστοιχα το σύνολο των παρατηρήσεων για το βακτήριο *L. monocytogenes* συγκεντρώνονται μεταξύ των τιμών 0,2 και 20% την

μηδενική μέρα. Έτσι, διαπιστώνεται ότι υπάρχει μια μικρή διακύμανση του ποσοστού μεταφοράς και των δυο μικροοργανισμών. Αυτό σημαίνει ότι υπό σταθερές συνθήκες (εμβόλιο, μαχαίρι, πίεση κατά την κοπή κλπ) η μεταφορά των κυττάρων από το μαρούλι στο μαχαίρι δεν χαρακτηρίζεται από μεγάλη αβεβαιότητα και είναι δυνατόν να εκτιμηθεί.

Σε ότι αφορά την επίδραση της παραμονής, τεσσάρων ημερών, των παθογόνων κυττάρων στο μαρούλι, στην μετέπειτα μεταφορά τους στο μαχαίρι διαπιστώνεται ότι δεν επηρεάζει σημαντικά. Η εικόνα της κατανομής των ποσοστών μεταφοράς του *E. coli* O157:H7 την 4^η ημέρα παραμένει η ίδια με αυτήν της μηδενικής ημέρας ενώ το 15% περίπου των παρατηρήσεων για το βακτήριο *L. monocytogenes* κυμάνθηκε μεταξύ 10 και 80%.

Στη συνέχεια, έγιναν μονές κοπές σε ανεμβολίαστο μαρούλι από επιμολυσμένο μαχαίρι, προκειμένου να μελετηθεί το ποσοστό μεταφοράς των μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα παρακάτω γραφήματα (Γραφήματα 3 α, β).





Γραφήματα 3α, β. Ιστόγραμμα κατανομής ποσοστού μεταφοράς του α) *L. monocytogenes* και β) *E. coli* O157:H7 από στείρο μαχαίρι σε μολυσμένο μαρούλι (100 μονές κοπές) τις ημέρες 0 και 4

Αντίστοιχα, στα παραπάνω γραφήματα (Γραφήματα 3 α, β) απεικονίζεται η κατανομή του ποσοστού μεταφοράς των κυττάρων α) του *L. monocytogenes* και β) του *E. coli* O157:H7 από μολυσμένο μαχαίρι σε ανεμβολίαστο μαρούλι μεταξύ 100 μονών κοπών που πραγματοποιήθηκαν σε αυτό. Ο τρόπος επιμόλυνσης του μαχαιριού, έγινε όπως περιγράφεται και στο κεφάλαιο των υλικών και μεθόδων στην παράγραφο 2.4.1, έγινε ύστερα από κοπή σε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού. Έτσι, ως μικροβιακό φορτίο του μαχαιριού θεωρήθηκε ο μέσος όρος των κυττάρων που ανακτήθηκαν ύστερα από 100 επαναλήψεις (μονές κοπές) από το μαχαίρι όταν αυτό πραγματοποιούσε κοπές σε μολυσμένο μαρούλι. Το ποσοστό μεταφοράς υπολογίστηκε ως **αριθμός κυττάρων (CFU) στο μαρούλι / (CFU) στο μαχαίρι *%**.

Παρατηρείται ότι, σε αντίθεση με τη μεταφορά μικροβιακών κυττάρων που υφίσταται από το μαρούλι στο μαχαίρι, η μεταφορά από το μαχαίρι στο μαρούλι είναι πιο ασταθές φαινόμενο, καθώς το πλήθος των τιμών δεν είναι συγκεντρωμένο σε κάποιο από τα άκρα ή στο κέντρο, αλλά είναι ομοιόμορφα μοιρασμένο σε όλο το εύρος της κατανομής. Έτσι, όσον αφορά το βακτήριο *E. Coli* O157:H7, κατά την 4^η

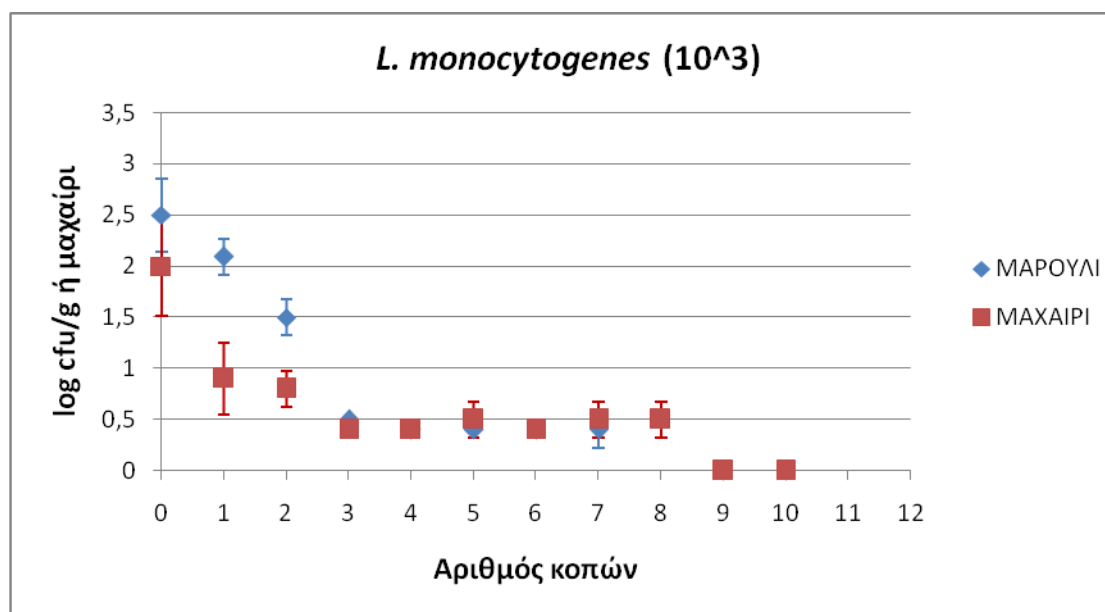
ημέρα, η συχνότητα των παρατηρήσεων, που παρουσιάζει μεταφορά των κυττάρων 90-100% από το μαχαίρι στο μαρούλι είναι ίδια με αυτήν που παρουσιάζει 0,1-10%, ενώ ελαφρώς μεγαλύτερη είναι η συχνότητα των παρατηρήσεων που παρουσιάζουν 90-100% μεταφορά των μικροβιακών κυττάρων την μηδενική ημέρα (35% των παρατηρήσεων). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζει και το βακτήριο *L. monocytogenes* την μηδενική ημέρα, απεικονίζοντας έτσι την αβεβαιότητα του φαινομένου. Η παραπάνω παρατήρηση υποδηλώνει ότι τα κύτταρα αποκολλήθηκαν πιο εύκολα από το μαχαίρι, παρά από την επιφάνεια του μαρουλιού, συνεπώς η προσκόλληση (attachment) των κυττάρων ήταν πιο χαλαρή στο μαχαίρι, από ότι στην επιφάνεια του μαρουλιού. Αυτή η παρατήρηση είναι σε αρμονία με άλλους ερευνητές (Ravishankar et al., 2010) οι οποίοι έδειξαν σχετικά υψηλό (45,62%) ρυθμό μεταφοράς των κυττάρων *Salmonella* Typhimurium από μολυσμένα μαχαίρια και επιφάνειες κοπής σε παρτίδες μαρουλιού, από ότι το αντίστροφο. Η διαφορά αυτή που σημειώνεται στην παρούσα εργασία είναι πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές δομικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των δύο επιφανειών, δηλαδή του μαχαιριού και του φυλλώδους λαχανικού. Τέτοιες ιδιότητες, όπως η επιφανειακή τάση, η τραχύτητα / στιλπνότητα της επιφάνειας, ή άλλοι περιβαλλοντικοί ή ενδογενείς παράγοντες, όπως η φυσιολογική κατάσταση του μικροοργανισμού και οι παράμετροι του μηχανισμού κοπής (δύναμη, ταχύτητα κοπής κλπ), είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη μεταφορά των κυττάρων από και προς τις επιφάνειες, καθιστώντας τον ρυθμό μεταφοράς εξαιρετικά απρόβλεπτο και τον υπολογισμό του εξαιρετικά πολύπλοκο (Hoelzer et al., 2012, Silva et al., 2008). Σε γενικές γραμμές, όσο μεγαλύτερη είναι η τραχύτητα μιας επιφάνειας, τόσο χαμηλότερος είναι ο ρυθμός μεταφοράς των προσκολλημένων, σε αυτή, κυττάρων (Sheen and Hwang, 2010). Εν προκειμένω, η επιφάνεια του φυλλώδους λαχανικού (μαρουλιού) είναι πιο «τραχιά» σε σχέση με την επιφάνεια του μαχαιριού, ενώ παράλληλα η ινώδης μορφή της ευνοεί τη διάχυση των βακτηριακών κυττάρων που βρίσκονται εσωτερικά των φυλλικών ιστών, γεγονός το οποίο πιθανώς να αποτελεί ένδειξη της ευκολότερης «αποκόλλησης» των κυττάρων από το μαχαίρι παρά από το μαρούλι, και κατ'επέκταση της ευρύτερης ποσοτικά μεταφοράς τους στο λαχανικό, από ότι το αντίστροφο.

Τέλος, από τα παραπάνω γραφήματα (Γραφήματα 4, 5, 6, 7), διαπιστώνουμε ότι δεν παρουσιάζεται αξιόλογη διαφορά στην διακύμανση και το ποσοστό μεταφοράς των μικροβιακών κυττάρων, μεταξύ φρέσκου (0 ημέρα) και παλαιού (4

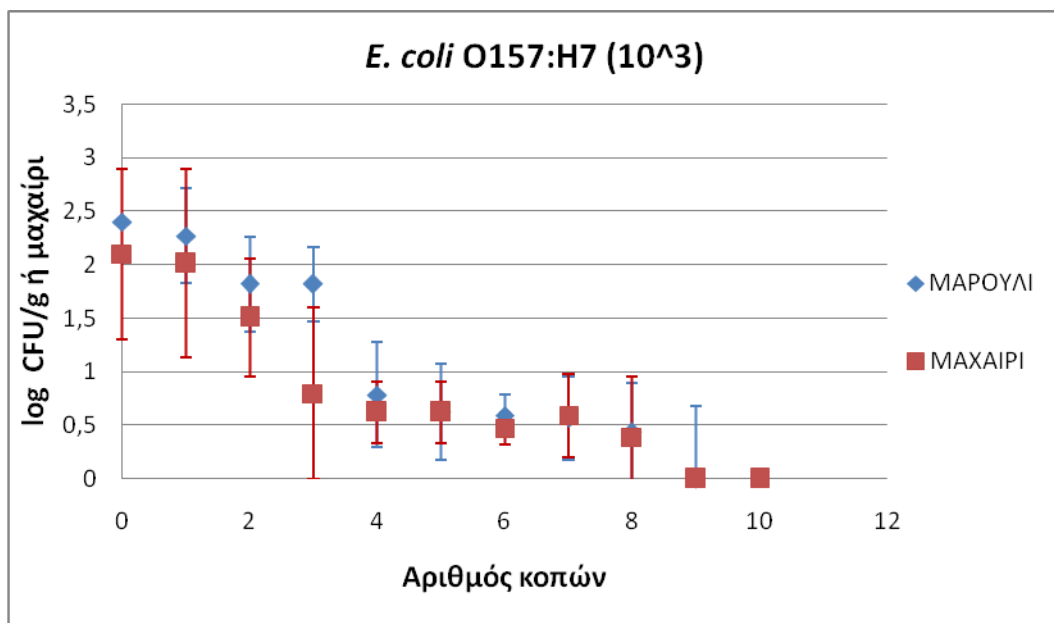
ημέρες) εμβολίου.

3.2 Μεταφορά των παθογόνων μικροβιακών κυττάρων από μολυσμένο μαχαίρι σε μαρούλι κατά την διαδικασία διαδοχικών κοπών

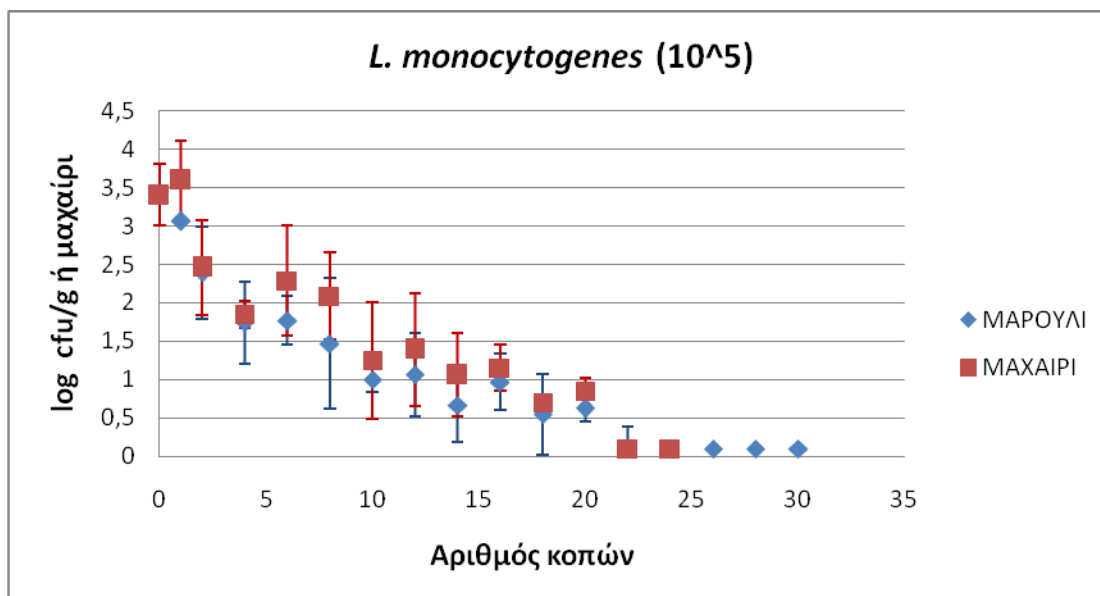
Στην συνέχεια της πειραματικής μελέτης, μελετήθηκε η πορεία της μεταφοράς των κυττάρων *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes* από μολυσμένο μαχαίρι σε ανεμβολίαστο μαρούλι, κατά την διαδικασία διαδοχικών κοπών. Χρησιμοποιήθηκαν δύο μεγέθη εμβολίου, υψηλό (10^5 log cfu/g) και χαμηλό (10^3 log cfu/g) προκειμένου να επιμολυνθεί το μαχαίρι. Το μαχαίρι επιμολύνθηκε κατόπιν κοπής σε παρτίδα εμβολιασμένων μαρουλιών (10^5 και 10^3 log cfu/g). Στην συνέχεια, το ίδιο μαχαίρι χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιηθούν διαδοχικές κοπές σε ανεμβολίαστο μαρούλι. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για τους δύο μικροοργανισμούς, για υψηλό (10^5 log cfu/g) και χαμηλό (10^3 log cfu/g) εμβόλιο.



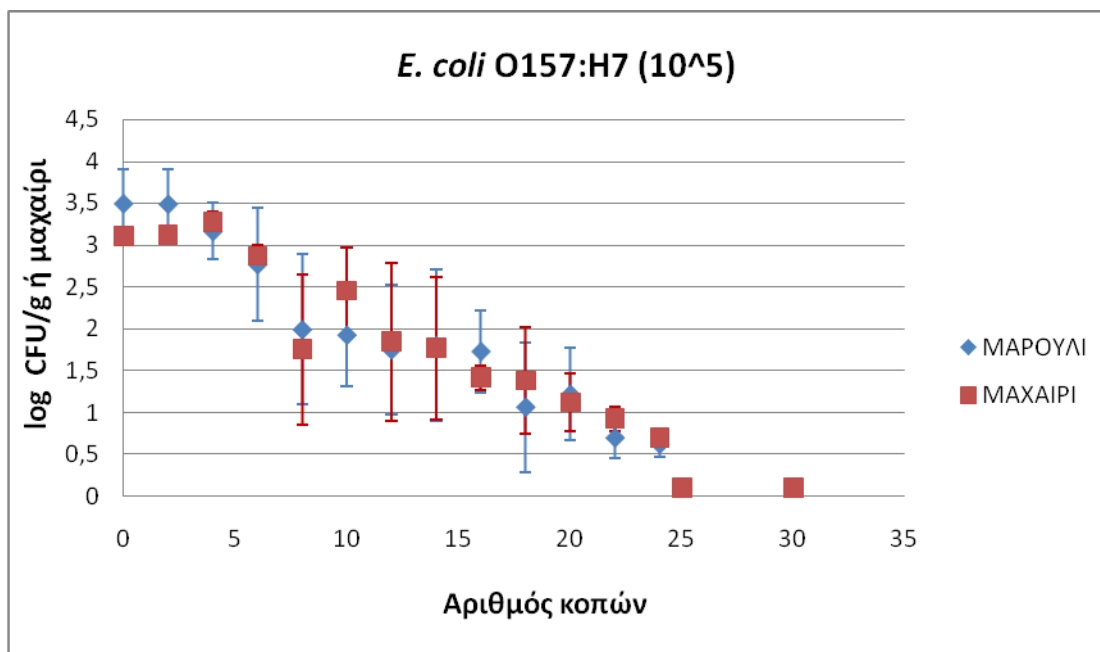
Γράφημα 4. Ποσοτική μεταφορά του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* από εμβολιασμένο μαχαίρι σε ανεμβολίαστο μαρούλι. Τα αποτελέσματα αφορούν τον μέσο όρο και τις τυπικές αποκλίσεις 4 επαναλήψεων. Η επιμόλυνση του μαχαιριού που χρησιμοποιήθηκε έγινε κατόπιν κοπής σε παρτίδα εμβολιασμένων (10^3 log cfu/g) μαρουλιών. Με ■ απεικονίζεται το φέρον μικροβιακό φορτίο του μαχαιριού μετά από κάθε κοπή, ενώ με ◆ η μεταφορά των κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι.



Γράφημα 5. Ποσοτική μεταφορά του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 από εμβολιασμένο μαχαίρι σε ανεμβολίαστο μαρούλι. Τα αποτελέσματα αφορούν τον μέσο όρο και τις τυπικές αποκλίσεις 4 επαναλήψεων. Η επιμόλυνση του μαχαιριού που χρησιμοποιήθηκε έγινε κατόπιν κοπής σε παρτίδα εμβολιασμένων (10^3 log cfu/g) μαρουλιών. Με ■ απεικονίζεται το φέρον μικροβιακό φορτίο του μαχαιριού μετά από κάθε κοπή, ενώ με ◆ η μεταφορά των κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι.



Γράφημα 6. Ποσοτική μεταφορά του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* από εμβολιασμένο μαχαίρι σε ανεμβολίαστο μαρούλι. Τα αποτελέσματα αφορούν τον μέσο όρο και τις τυπικές αποκλίσεις 4 επαναλήψεων. Η επιμόλυνση του μαχαριού που χρησιμοποιήθηκε έγινε κατόπιν κοπής σε παρτίδα εμβολιασμένων (10^5 log cfu/g) μαρουλιών. Με ■ απεικονίζεται το φέρον μικροβιακό φορτίο του μαχαριού μετά από κάθε κοπή, ενώ με ◆ η μεταφορά των κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι.



Γράφημα 7. Ποσοτική μεταφορά του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 από εμβολιασμένο μαχαίρι σε ανεμβολίαστο μαρούλι. Τα αποτελέσματα αφορούν τον μέσο όρο και τις τυπικές αποκλίσεις 4 επαναλήψεων. Η επιμόλυνση του μαχαριού που χρησιμοποιήθηκε έγινε κατόπιν κοπής σε παρτίδα εμβολιασμένων (10^5 log cfu/g) μαρουλιών. Με ■ απεικονίζεται το φέρον μικροβιακό φορτίο του μαχαριού μετά από κάθε κοπή, ενώ με ◆ η μεταφορά των κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι.

Στα παραπάνω γραφήματα (Γραφήματα 4,5,6,7) απεικονίζεται η ποσοτική μεταφορά των κυττάρων των παθογόνων μικροοργανισμών *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes*, που λαμβάνει χώρα τόσο στο μαχαίρι, όσο και στο μαρούλι, κατά τη διαδικασία διαδοχικών κοπών. Οι τιμές του γραφήματος προκύπτουν από τον μέσο όρο τεσσάρων επαναλήψεων.

Όπως παρατηρείται από τα γραφήματα, η μεταφορά των κυττάρων τόσο του βακτηρίου *E. coli* O157:H7, όσο και του *L. monocytogenes*, δεν είναι γραμμική. Αντίθετα, χαρακτηρίζεται από δυο διακριτούς ρυθμούς αποκόλλησης των κυττάρων από το μαχαίρι, και μετακίνησης τους προς το μαρούλι. Αρχικά, παρατηρείται η ταχύτερη μεταφορά του πληθυσμού των παθογόνων από το μαχαίρι στο μαρούλι η οποία καταλήγει σε μια ασυμπτωτική με τον άξονα των x «ουρά» (tailing) χαμηλών πληθυσμών σε μαρούλι και μαχαίρι. Το tailing των χαμηλών πληθυσμών αφορά τον δεύτερο, βραδύ, ρυθμό μεταφοράς των μικροβιακών κυττάρων. Ο βραδύς αυτός

ρυθμός μεταφοράς, οφείλεται αφενός στους χαμηλούς πληθυσμούς κυττάρων που απομένουν στο μαχαίρι με το πέρας των κοπών, αφετέρου στο είδος του «δεσμού» που δημιουργούν οι πληθυσμοί αυτοί με το μαχαίρι. Η ισχυρότερη προσκόλληση των κυττάρων στο μαχαίρι προσδιορίζει, τόσο τον ρυθμό αποκόλλησής τους, όσο και την μεταφοράς τους στο λαχανικό.

Συγκρίνοντας την μεταφορά των δυο μικροοργανισμών, σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι το προφίλ μεταφοράς (οι δυο διακριτοί ρυθμοί) δεν διαφέρει. Ωστόσο παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός *E. coli* O157:H7, παρουσιάζει παρατεταμένη μεταφορά, συγκριτικά με τον *L. monocytogenes*. Σε μαχαίρι που φέρει αρχικό μικροβιακό φορτίο 10^3 - 10^4 log cfu/μαχαίρι, τα κύτταρα του βακτηρίου *L. monocytogenes* μειώνονται λογαριθμικά τουλάχιστον κατά 2 log cfu/μαχαίρι μετά από 10 κοπές ενώ μετά από 22 κοπές τα επίπεδα του πληθυσμού των κυττάρων του, είναι κάτω του ορίου ανίχνευσης σε μαρούλι και μαχαίρι. Ο μικροοργανισμός παύει πλέον να ανιχνεύεται ακόμα και ύστερα από εμπλουτισμό μετά την κοπή 26. Παράλληλα, σε μαχαίρι το οποίο φέρει αρχικό μικροβιακό φορτίο 10^2 log cfu/μαχαίρι, τα κύτταρα του βακτηρίου *L. monocytogenes* παρουσιάζουν λογαριθμική μείωση τουλάχιστον κατά 1,5 log cfu/μαχαίρι μετά από 3 κοπές, ενώ ο μικροοργανισμός παύει πλέον να ανιχνεύεται ακόμα και ύστερα από εμπλουτισμό μετά την 9^η κοπή. Σε σχέση με το *L. monocytogenes*, το *E. coli* O157:H7, φαίνεται να «ανθίσταται» περισσότερο στη μεταφορά από το μαχαίρι στο μαρούλι. Έτσι, σε μαχαίρι το οποίο αρχικά φέρει 10^3 - 10^4 log cfu/μαχαίρι, μετά από 10 κοπές, έχουν μεταφερθεί 1-1,5 log cfu/g του παθογόνου στο μαρούλι, ενώ τα επίπεδα του πληθυσμού του συνεχίζουν να είναι μετρήσιμα (στο όριο ανίχνευσης) μετά από 24 κοπές. Το *E. coli* O157:H7 ανιχνεύεται με την μέθοδο του εμπλουτισμού σε μαρούλι και μαχαίρι ακόμα και στην 29^η κοπή. Παράλληλα, σε μαχαίρι το οποίο αρχικά φέρει 10^2 - 10^3 log cfu/μαχαίρι τα κύτταρα του βακτηρίου *E. coli* O157:H7, μετά από 6 κοπές, παρουσιάζουν λογαριθμική μείωση κατά 1,5 log cfu/g, ενώ ανιχνεύονται με την μέθοδο του εμπλουτισμού, σε μαρούλι και μαχαίρι, ακόμα και στην 10^η κοπή. Το φαινόμενο αυτό, εξηγείται από το γεγονός ότι ο *E. coli* O157:H7 είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο συνεπώς περιβάλλεται από δύο κυτταρικές μεμβράνες. Αυτό αυτόματα του προσδίδει το πλεονέκτημα της ισχυρότερης προσκόλλησης των κυττάρων του στην επιφάνεια του μαχαιριού με αποτέλεσμα να παρατηρείται στις πρώτες κοπές δυσκολότερη αποκόλληση και κατ' επέκταση μικρότερη μεταφορά σε

σύγκριση με το βακτήριο *L. monocytogenes*, που είναι θετικό κατά Gram και κατά συνέπεια, περιβάλλεται από μία κυτταρική μεμβράνη (Skandamis P., 2009).

Συνήθως σε επιφάνειες όπως εκείνες των μαχαιριών, η ανάκτηση των μικροβιακών κυττάρων γίνεται με την χρήση μπατονέτας, προκειμένου να προσδιοριστεί το ποσοστό των προσκολλημένων κυττάρων (Chenet al. 2000, Lubet et al. 2006). Το ποσοστό ανάκτησης των κυττάρων καθορίζει το ποσοστό μεταφοράς των κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι.

Επιπλέον, συγκρίνοντας τα γραφήματα των δύο μικροοργανισμών, παρατηρείται ότι το βακτήριο *E. coli* O157:H7 σχηματίζει ένα «πλατό» στις πρώτες κοπές, σε αντίθεση με το βακτήριο *L. monocytogenes*, που παρουσιάζει μια απότομη μείωση. Το πλατό, είναι και αυτό αποτέλεσμα του γεγονότος ότι το *E. coli* O157:H7, είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο. Έτσι, αρχικά τα κύτταρα είναι ισχυρά προσκολλημένα στο μαχαίρι, αλλά με το πέρας των κοπών, το λαχανικό απελευθερώνει τους χυμούς του, ενυδατώνοντας το μαχαίρι. Η ενυδάτωση αυτή συμβάλλει στην πιο εύκολη αποκόλληση των ισχυρά προσκολλημένων κυττάρων.

3.3 Προσαρμογή του μοντέλου

Στην συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας ένα μαθηματικό μοντέλο δημιουργήθηκε για να περιγράψει την μεταφορά των κυττάρων των μικροοργανισμών *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes* σε φρέσκο λαχανικό κατά τον τεμαχισμό του από επιμολυσμένο μαχαίρι. Το εν λόγω μοντέλο, βασίστηκε στο μοντέλο που πρότειναν οι Møller et al. (2012), για να προβλέψουν τη μεταφορά (log CFU/g) του μικροοργανισμού *Salmonella* Typhimurium DT104, κατά τον τεμαχισμό χοιρινού κρέατος. Η προσαρμογή και επικύρωση του μοντέλου βασίστηκε στα δεδομένα που συλλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη. Για την προσαρμογή του μοντέλου, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα που προέκυψαν από διαδοχικές κοπές ανεμβολίαστου μαρουλιού με μαχαίρι που προηγουμένως είχε επιμολυνθεί με κοπή σε εμβολιασμένη (10^5 log cfu/g) παρτίδα μαρουλιού (Γραφήματα 6, 7). Έτσι το μαχαίρι έφερε κύτταρα *E. coli* O157:H7 ή *L. monocytogenes*.

Όπως αναφέρεται παραπάνω (παράγραφο 3.2), η μεταφορά των κυττάρων τόσο του βακτηρίου *E. coli* O157:H7, όσο και του *L. monocytogenes*, δεν είναι γραμμική. Χαρακτηρίζεται από δυο διακριτούς ρυθμούς αποκόλλησης των κυττάρων

από το μαχαίρι και μετακίνησης τους προς το μαρούλι. Ο πρώτος ρυθμός είναι ταχύς και ο δεύτερος αργός. Παρόμοια εικόνα έδωσαν και τα αποτελέσματα της μελέτης των Møller et al. (2012). Σε αυτό το γεγονός βασίστηκαν και πρότειναν ένα μοντέλο στο οποίο γίνεται η υπόθεση ότι το μαχαίρι έχει δύο υποπεριβάλλοντα (σχετική αναφορά γίνεται στο κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.5). Το υποπεριβάλλον (1) περιγράφει την ταχεία μεταφορά των κυττάρων λόγω ισχυρής προσκόλλησής τους στο μαχαίρι, ενώ το υποπεριβάλλον (2) την βραδεία μεταφορά των κυττάρων, λόγω ασθενούς προσκόλλησής τους στο μαχαίρι.

Το μοντέλο που προτάθηκε από τους Nauta et al. (2005), περιγράφει την διασταυρούμενη επιμόλυνση του μικροοργανισμού *Campylobacter* σε πουλερικά κατά την επεξεργασία τους, δεν μπορεί να εξηγήσει το tailing χαμηλής μεταφοράς των κυττάρων. Αντίθετα, το μοντέλο που προτείνεται στην παρούσα μελέτη, περιγράφει τον σχηματισμό ενός ασυμπτωτικού tailing που δείχνει την χαμηλή μεταφορά των κυττάρων στο μαρούλι και το χαμηλό φέρον μικροβιακό φορτίο στο μαχαίρι.

Απαραίτητος κρίθηκε ο υπολογισμός των παραμέτρων **a1**, **a2**, **b1**, **b2**, **c3**, **1-c3**. Οι παράμετροι υπολογίστηκαν με την εφαρμογή Solver του Excel, έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται οι διαφορές μεταξύ των προβλεπόμενων και των πραγματικών τιμών μεταφοράς των κυττάρων των μικροοργανισμών. Ο υπολογισμός των παραμέτρων, στηρίχθηκε στα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη και έγινε ξεχωριστά για τους δύο μικροοργανισμούς (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Τιμές των παραμέτρων που υπολογίστηκαν κατά την προσαρμογή του μοντέλου, για κάθε μικροοργανισμό.

Παράμετροι	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>L. monocytogenes</i>
a1	0,047581	0,250013
a2	0,160771	0,467061
b1	0,165493	0,302927
b2	0,008902	0,11678
1-c3	0,787567	0,440567

Απαραίτητος κρίθηκε ο υπολογισμός του συντελεστή **RMSE** που εκφράζει την ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος των προβλεπόμενων και πραγματικών τιμών στην μεταφορά. Ο εν λόγω συντελεστής αποτελεί κριτήριο της προσαρμογής του μοντέλου. Οι τιμές του RMSE κυμαίνονται από 0,799 έως 0,907 και από 0,426 έως 0,613 για *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes*, αντίστοιχα. Οι χαμηλές τιμές του RMSE, δείχνουν ότι οι τιμές που προβλέπει το μοντέλο είναι πολύ κοντά στις πραγματικές (Valero et al. 2007). Ως εκ τούτου, μπορεί να θεωρηθεί ότι υπήρξε ικανοποιητική η προσαρμογή των δεδομένων στο μοντέλο (Motulsky και Christopoulos, 2003).

3.4 Επικύρωση του μοντέλου

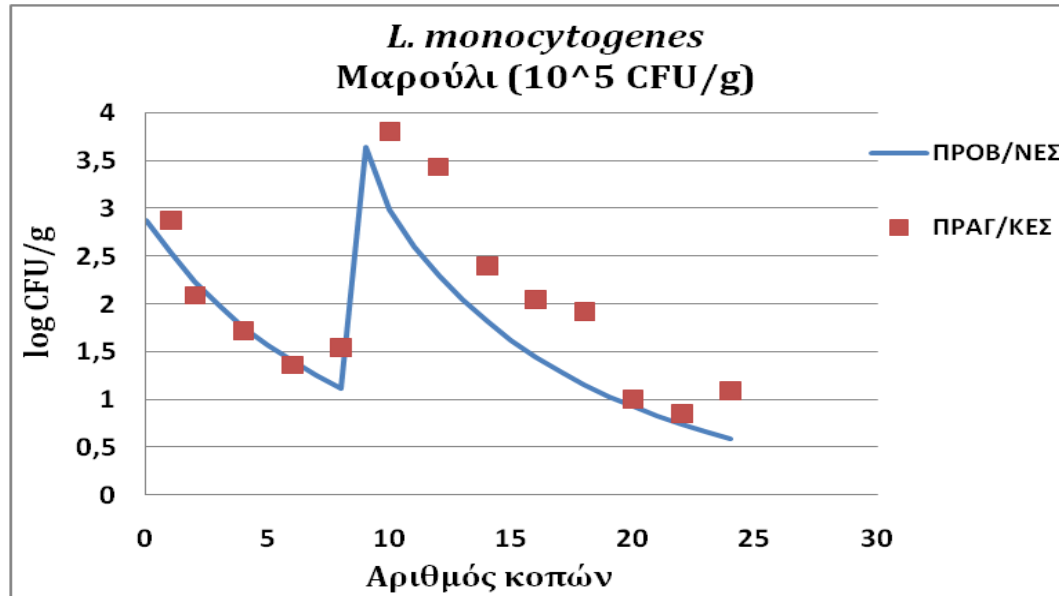
Μετά τον υπολογισμό των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν για την προσαρμογή του μοντέλου, η ικανότητα του να προβλέπει την μεταφορά των παθογόνων βακτηρίων από μαχαίρι σε μαρούλι αξιολογήθηκε πειραματικά και εκτιμήθηκε η επίδοση του. Για την επικύρωση και αξιολόγηση του μοντέλου, πραγματοποιήθηκε η συλλογή δεδομένων τόσο για τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, όσο και για τον *E. coli* O157:H7. Τα πειράματα επικύρωσης περιελάμβαναν διαφορετικά σενάρια παρεμβολής εμβολιασμένης παρτίδας λαχανικού (10^5 CFU/g και 10^3 CFU/g) κατά την διαδικασία διαδοχικών κοπών ανεμβολίαστων παρτίδων.

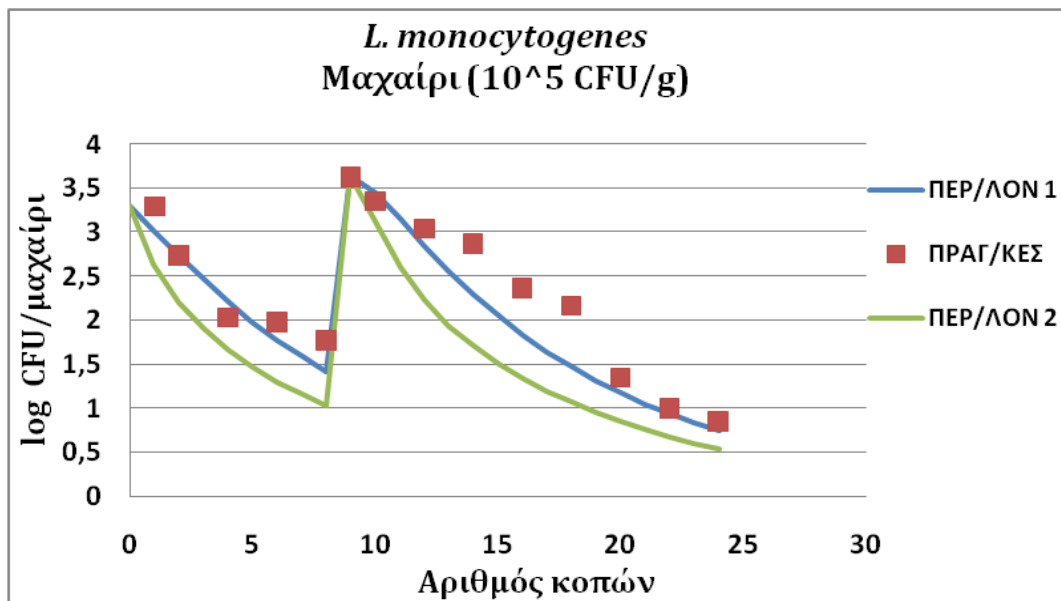
Στα παρακάτω γραφήματα, παρουσιάζονται οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές του υποπεριβάλλοντος (1) (■) του μαχαιριού, οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές του υποπεριβάλλοντος (2) (■) καθώς και οι πραγματικές (■) τιμές. Το μοντέλο βασιζόμενο στις παραμέτρους a_1 , a_2 , b_1 , b_2 , c_3 , $1-c_3$, προσομοιάζει όσο το δυνατόν, την πραγματική κατάσταση μεταφοράς των κυττάρων των παθογόνων βακτηρίων.

Στα γραφήματα (α), απεικονίζεται ο πληθυσμός των κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* που μεταφέρθηκε, από το μαχαίρι στο μαρούλι, κατόπιν κάθε κοπής. Το μαχαίρι αρχικά, επιμολύνθηκε μέσω μίας κοπής σε εμβολιασμένη (10^5 CFU/g) παρτίδα μαρουλιού. Στα γραφήματα (β), απεικονίζεται το τελικό φέρον μικροβιακό φορτίο των δύο επιφανειών του μαχαιριού, αμέσως μετά την μεταφορά των κυττάρων στο μαρούλι, κατόπιν κάθε κοπής. Ωστόσο, σε κάθε

γράφημα παρουσιάζεται τόσο η πρόβλεψη του μοντέλου τόσο για την ταχεία (■), όσο και για την βραδεία (■) μεταφορά των μικροβιακών κυττάρων οι οποίες οφείλονται στην χαλαρή και την ισχυρή προσκόλλησή τους στο μαχαίρι, αντίστοιχα.

α

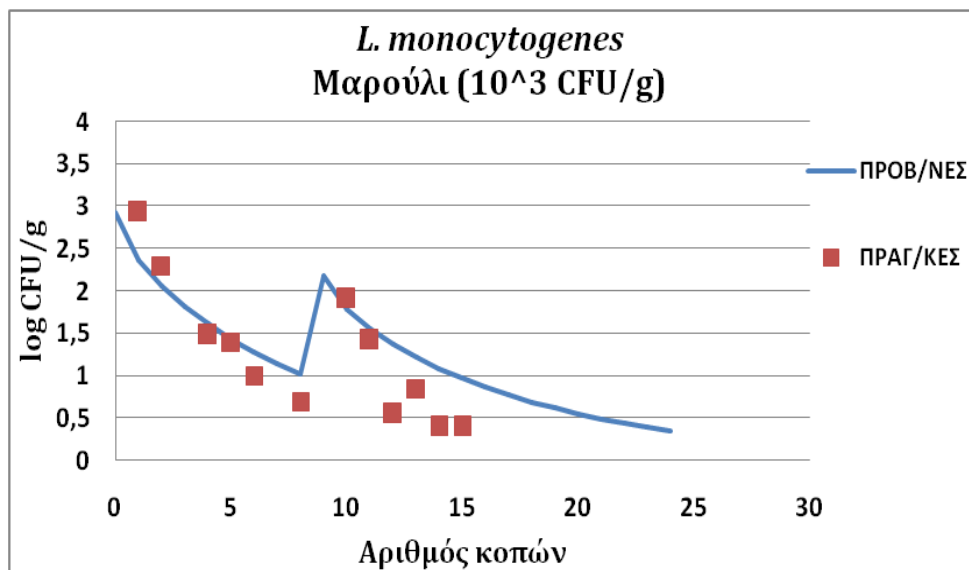




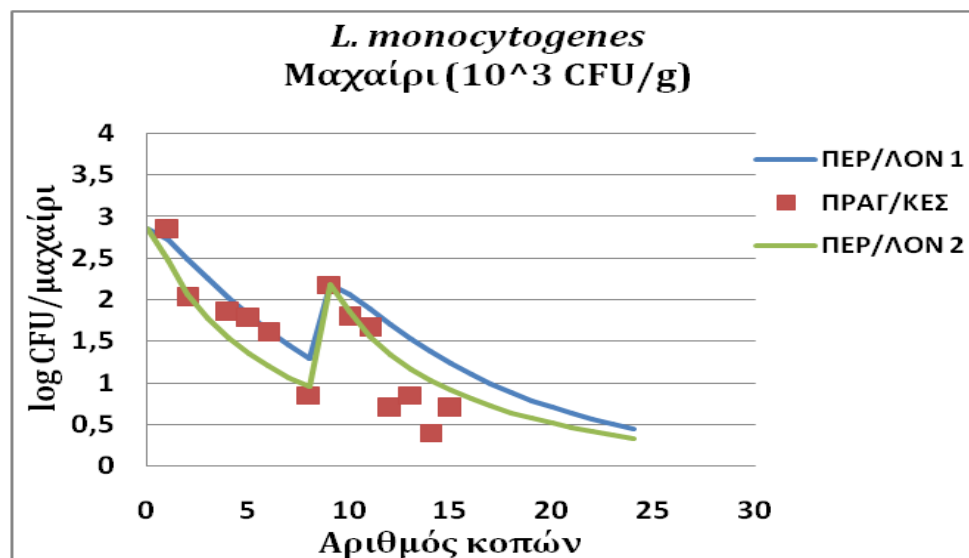
Bf	0,809803
Af	1,2559

Γράφημα 8 α, β, γ. Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *L. monocytogenes*, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10⁵ CFU/g) στην κοπή 9, κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίο μαχαίριού (β)

α



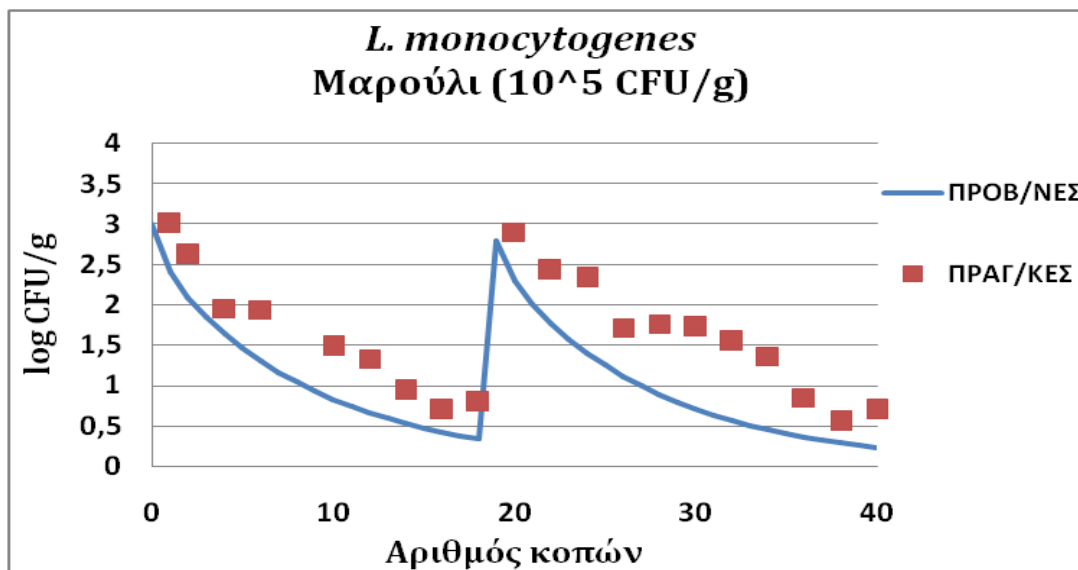
β



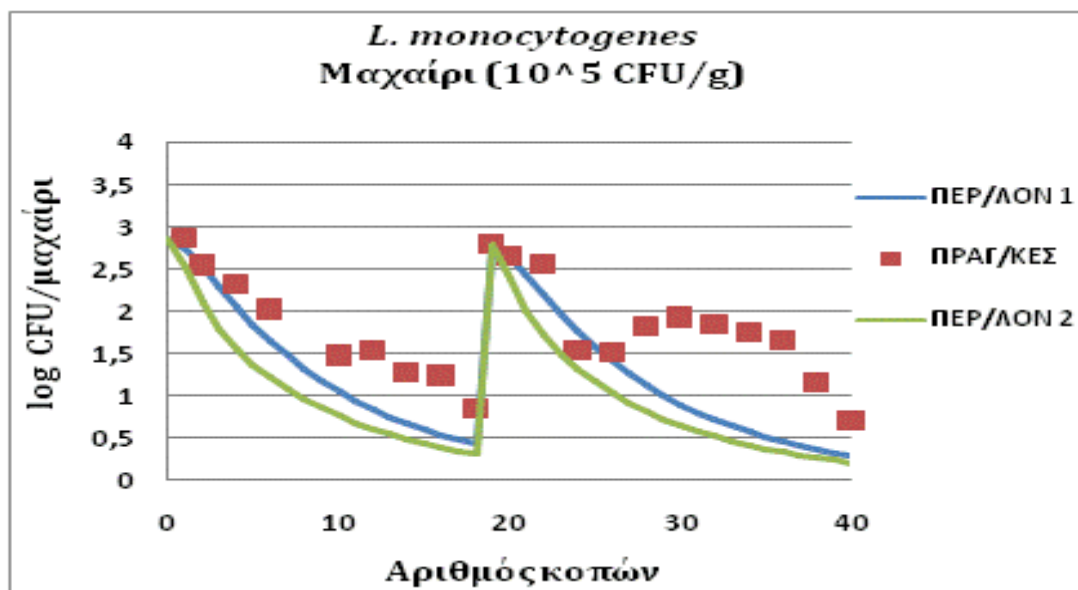
Bf	1,295434
Af	1,376692

Γράφημα 9 α, β, γ. Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *L. monocytogenes*, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10³CFU/g) στην κοπή 9, κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίου μαχαιριού (β).

α



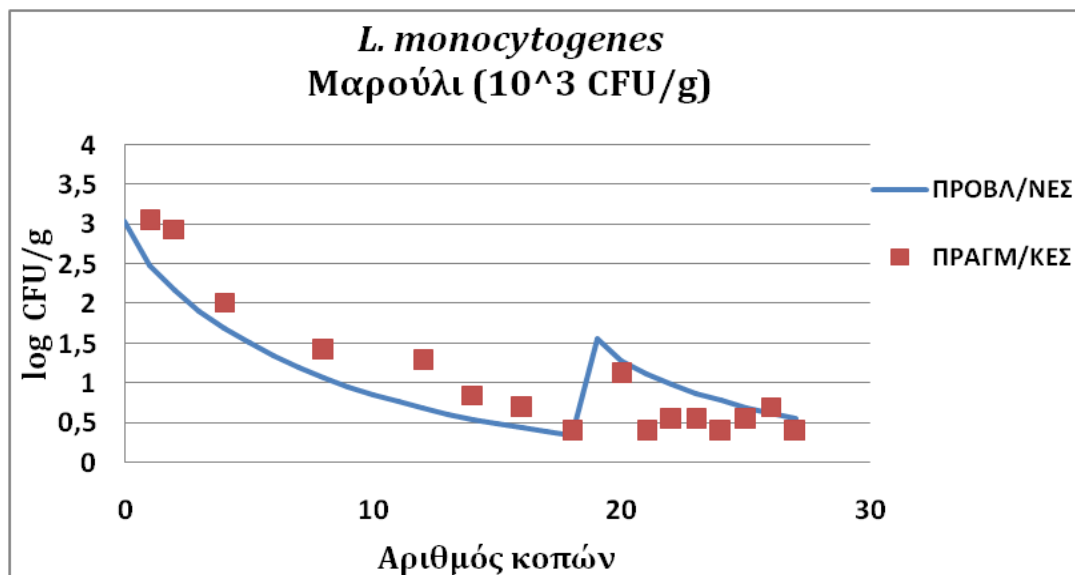
β



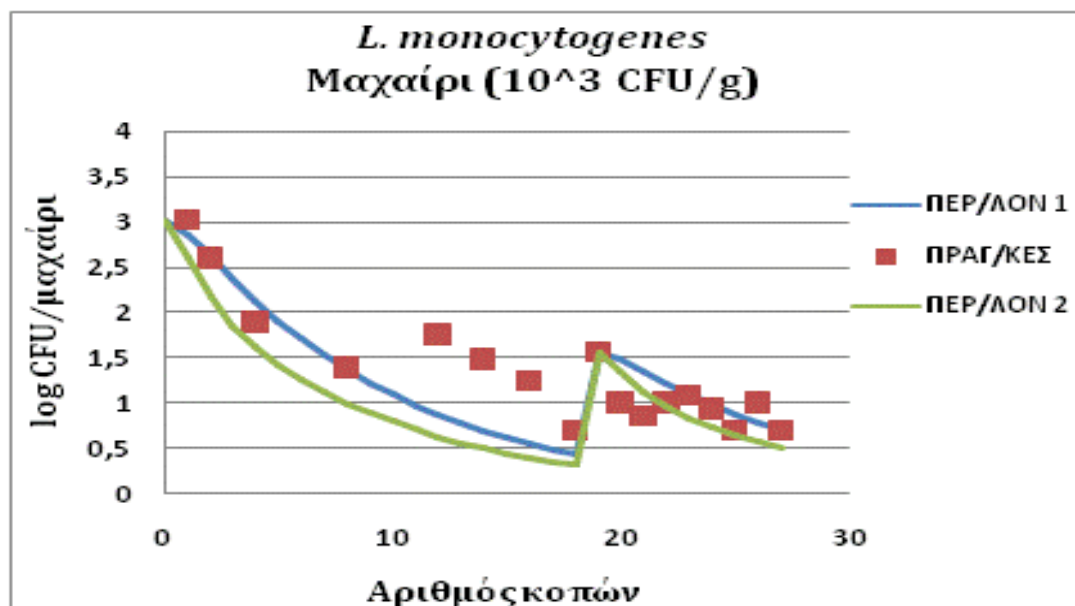
Bf	0,563222
Af	1,775498

Γράφημα 10 α, β, γ. Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *L. monocytogenes*, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10⁵ CFU/g) στην κοπή 19, κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίου μαχαριού (β).

α



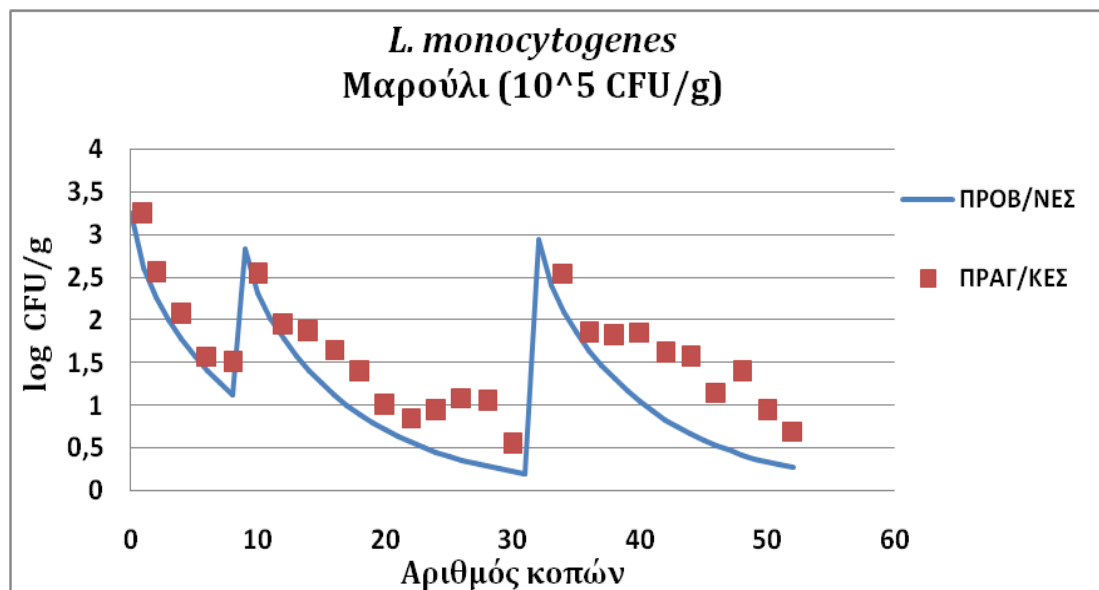
β



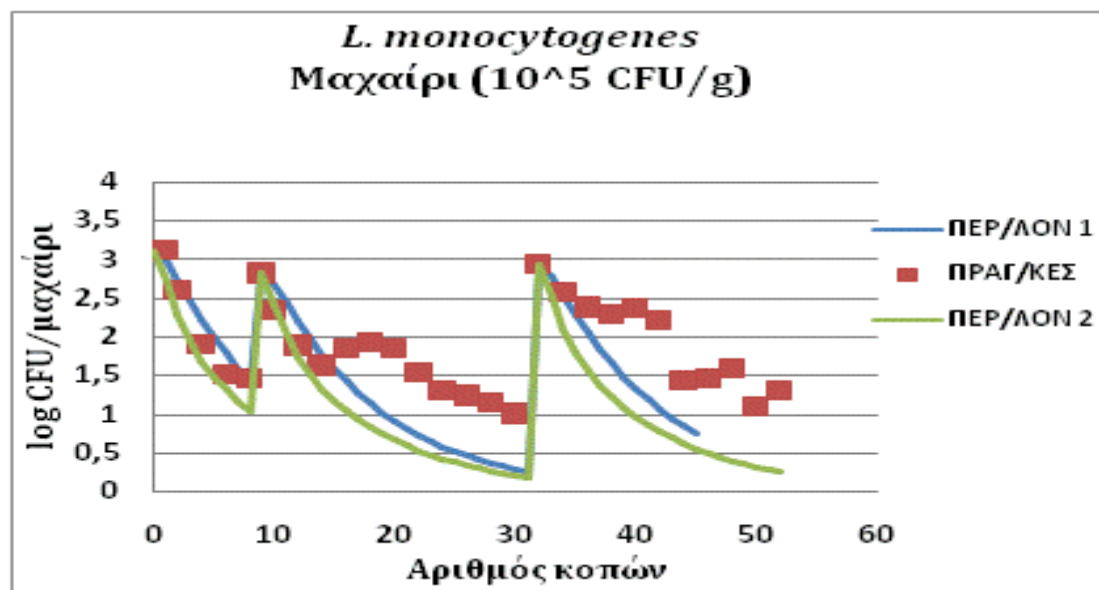
Bf	1,042404
Af	1,442524

Γράφημα 11 α, β, γ. Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *L. monocytogenes*, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10³ CFU/g) στην κοπή 19, κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίου μαχαιριού (β).

α



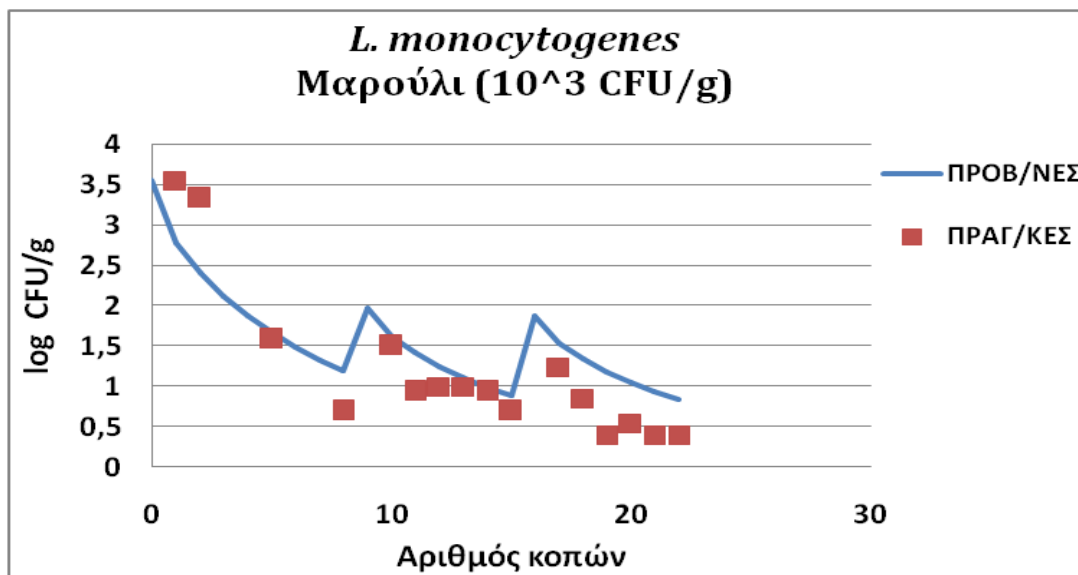
β



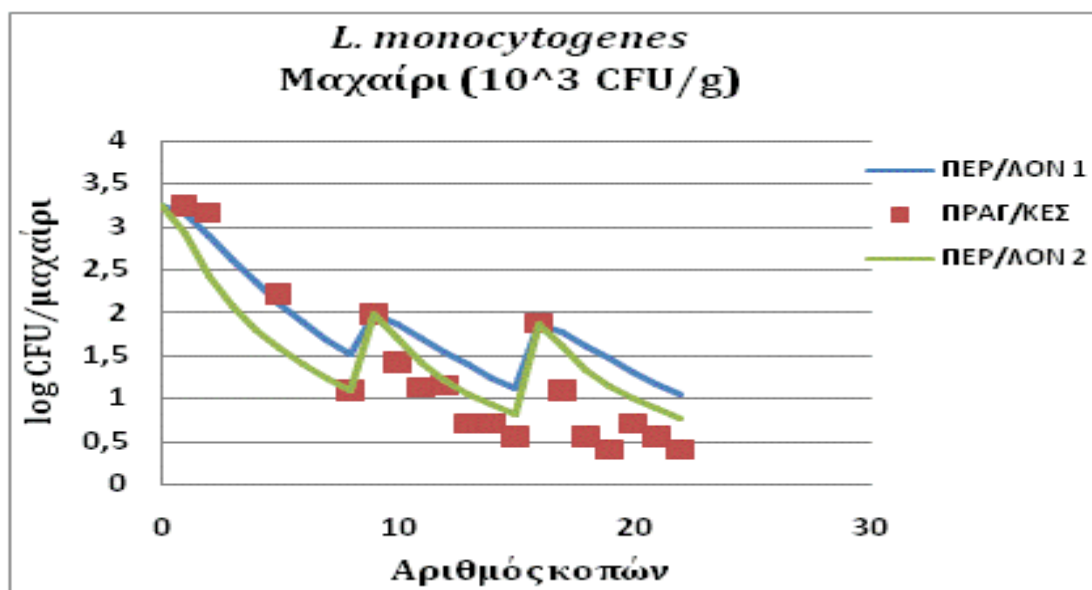
Bf	0,621742
Af	1,639126

Γράφημα 12 α, β, γ . Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *L. monocytogenes*, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10⁵CFU/g) στις κοπές 9 και 32 κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχάρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίου μαχαιριού (β).

α



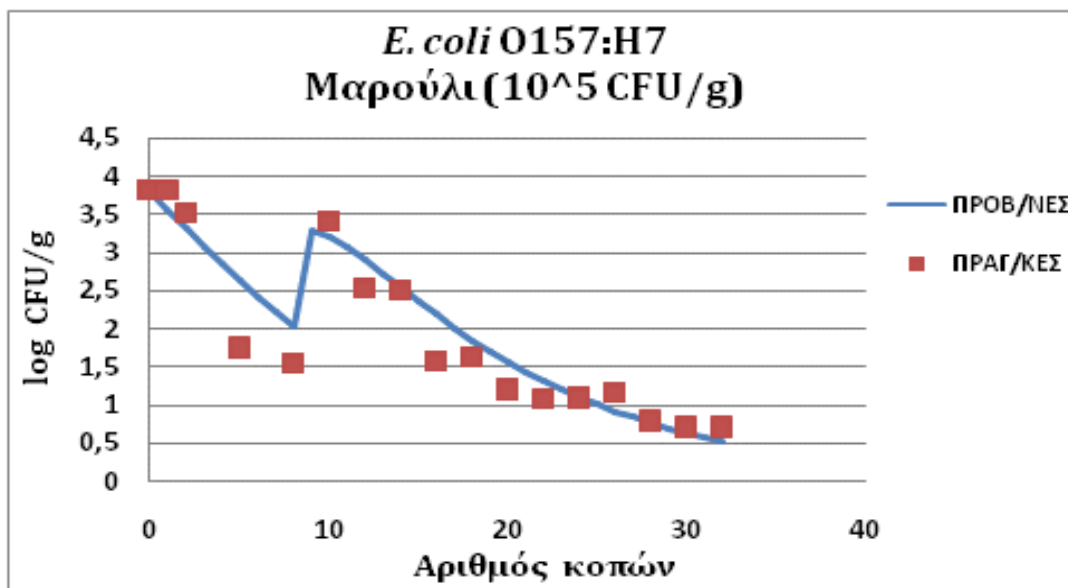
β



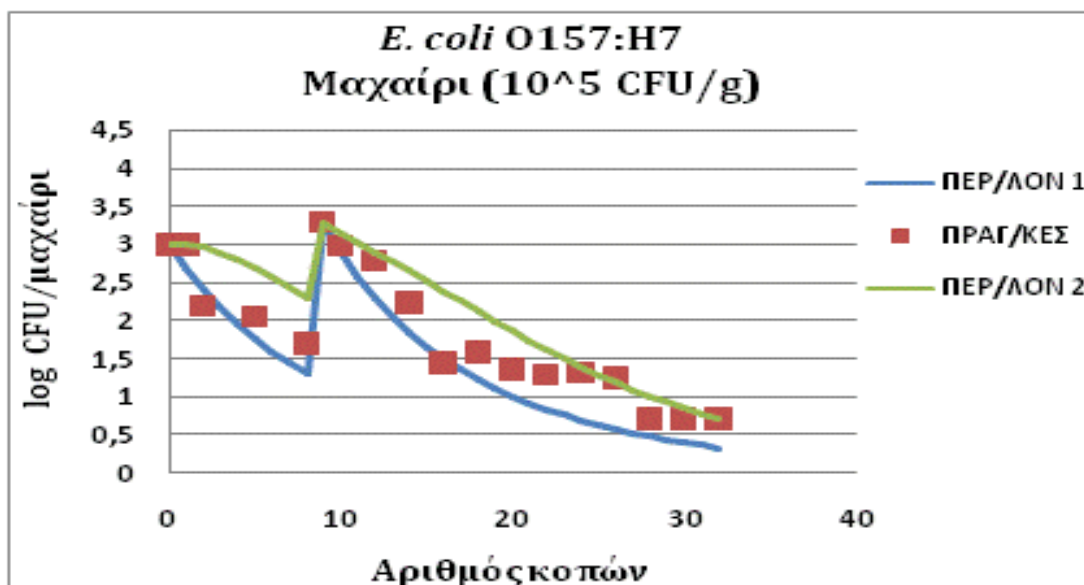
Bf	1,349883
Af	1,443611

Γράφημα 13 α, β, γ . Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *L. monocytogenes*, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10^3 CFU/g)στις κοπές 9 και 16 κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχάιρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίου μαχαιριού (β).

α



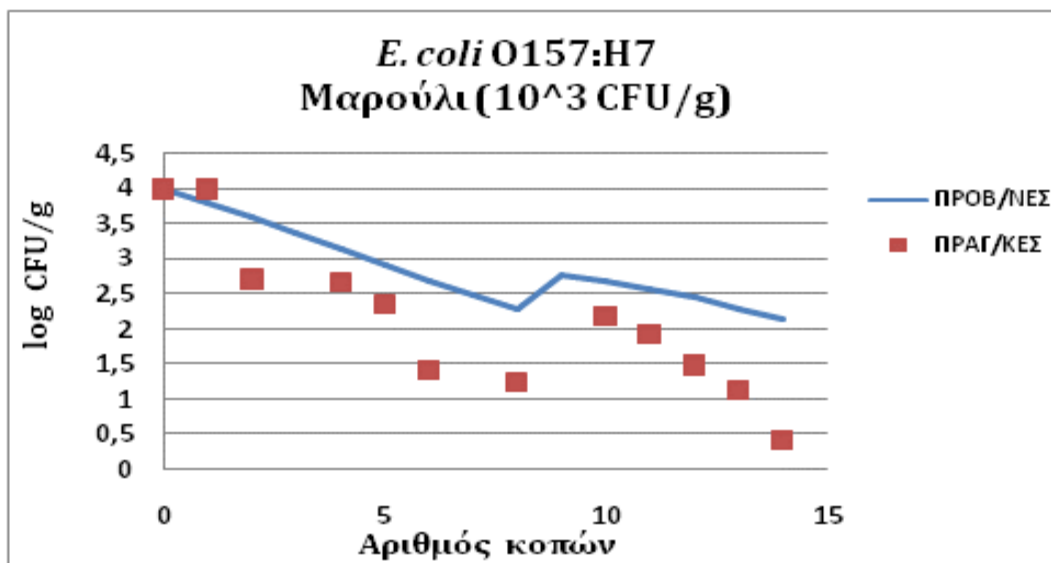
β



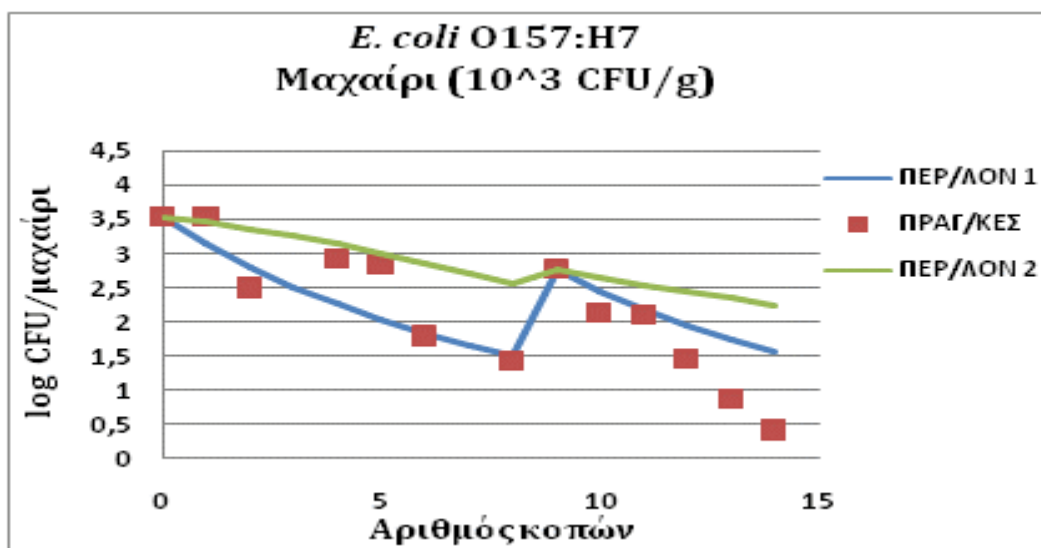
Bf	1,057923
Af	1,164094

Γράφημα 14 α, β, γ . Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *E. coli* O157:H7, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10⁵CFU/g) στην κοπή 9 κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίου μαχαίριού (β).

α



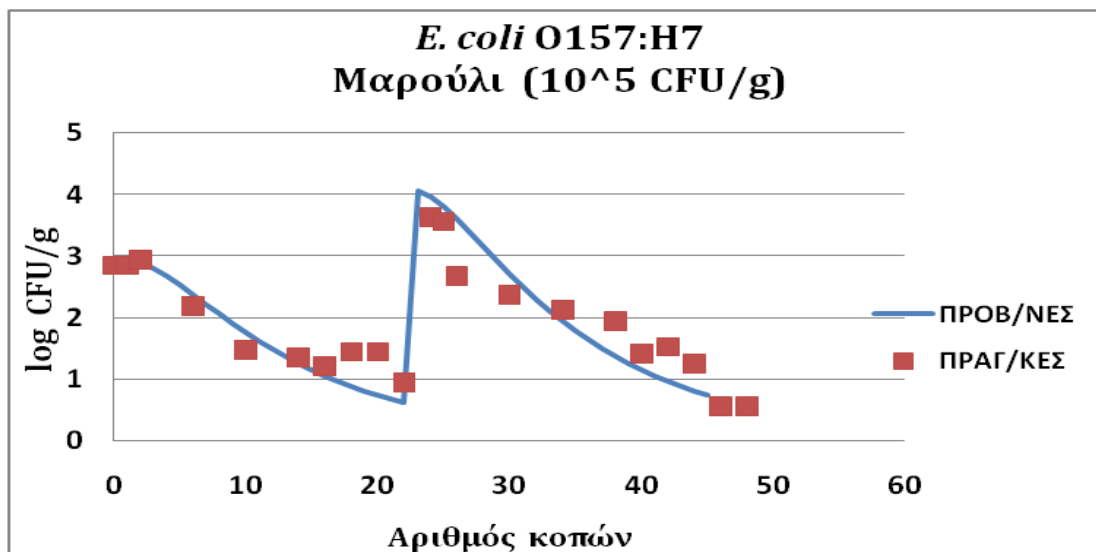
β



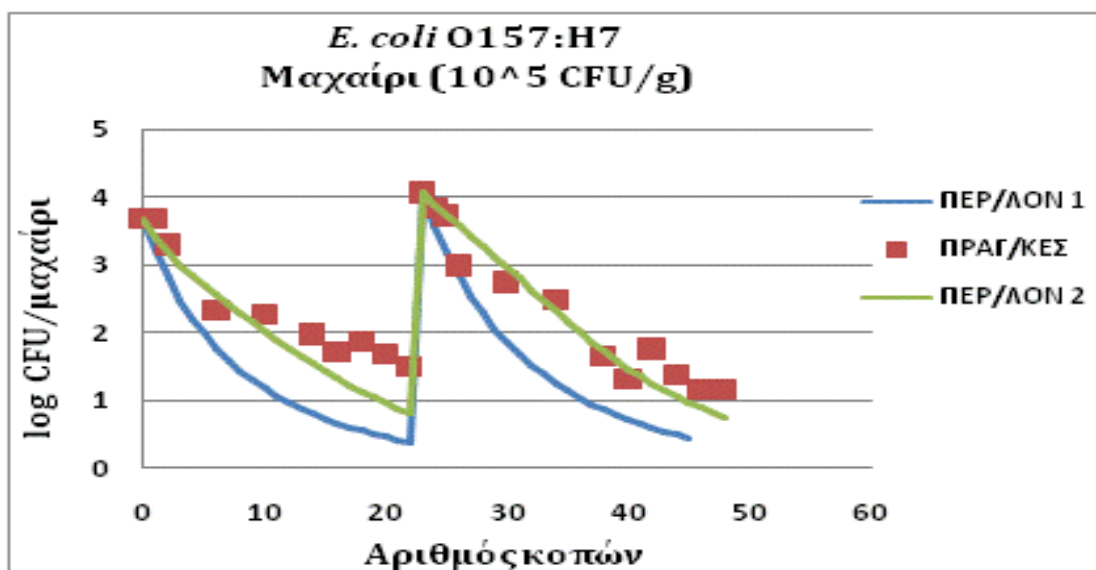
Bf	1,426821
Af	1,437102

Γράφημα 15 α, β, γ. Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *E. coli* O157:H7, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10³CFU/g) στην κοπή 9 κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίου μαχαιριού (β).

α



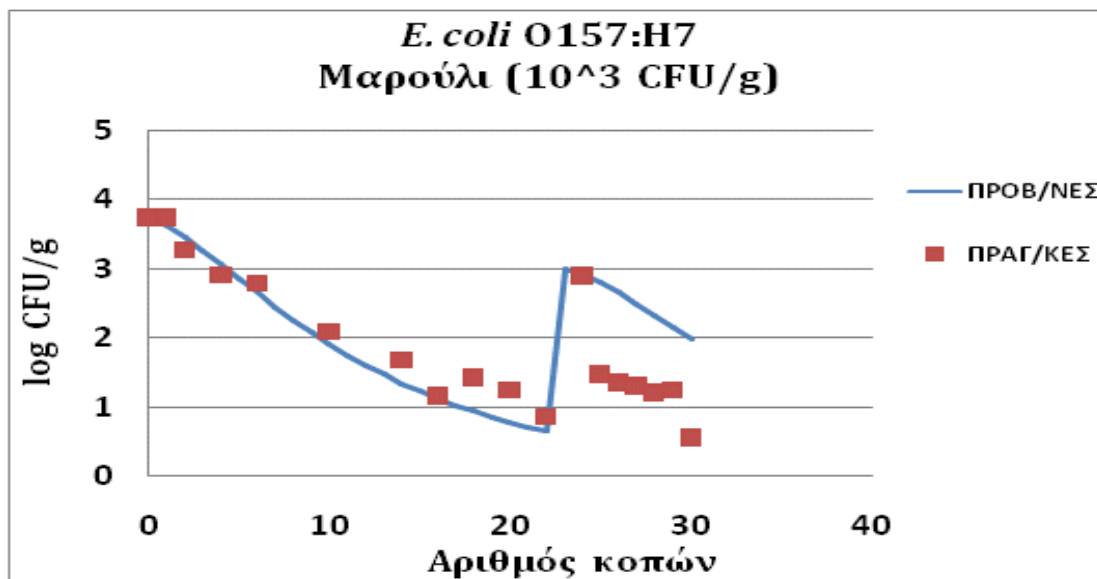
β



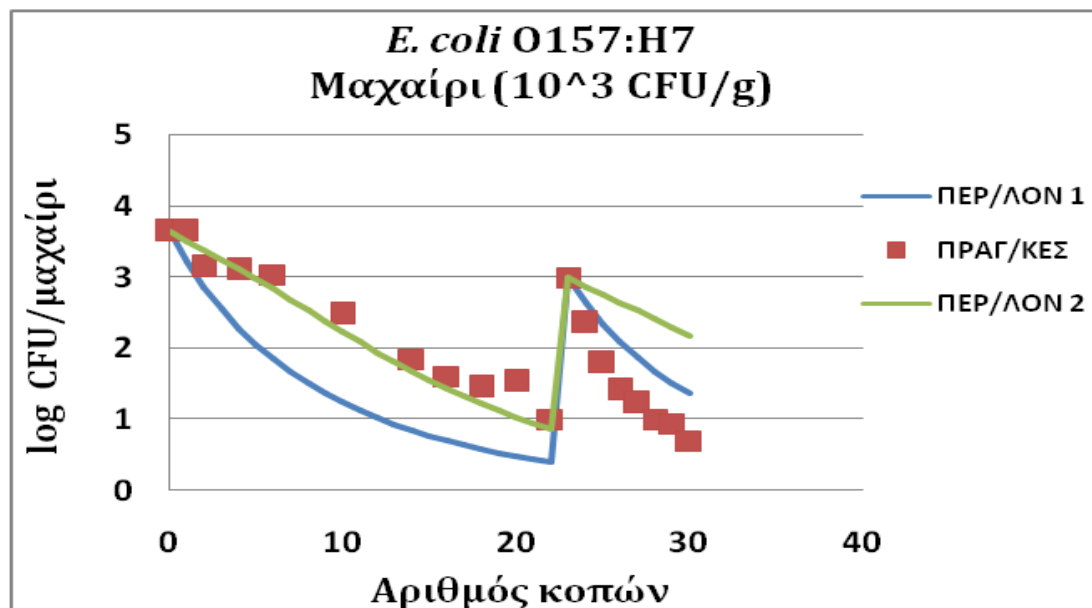
Bf	0,889772
Af	1,23928

Γράφημα 16 α, β, γ . Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *E. coli* O157:H7, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10⁵ CFU/g) στην κοπή 23 κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίου μαχαίριου (β).

α



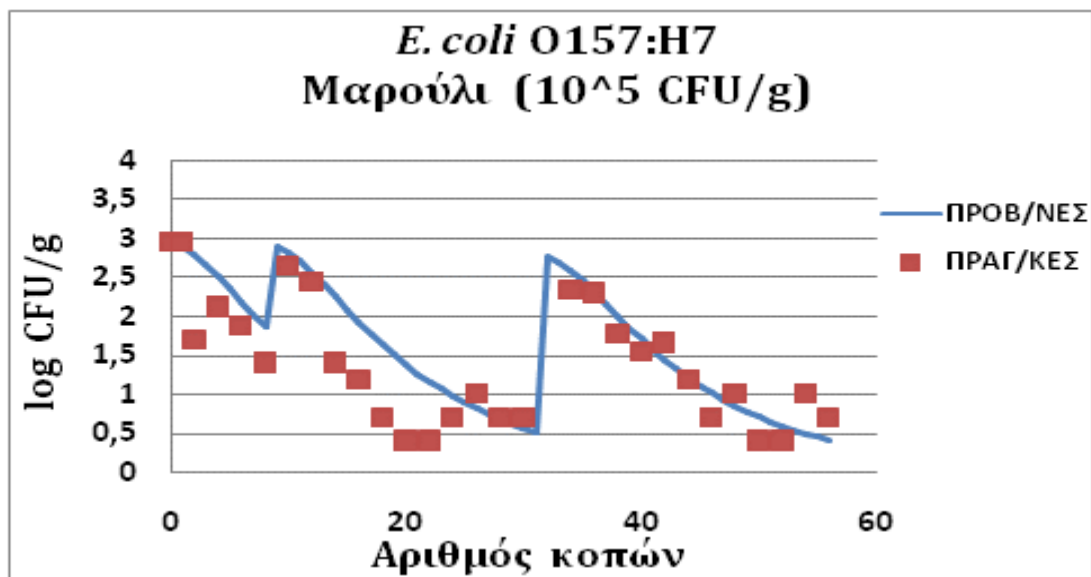
β



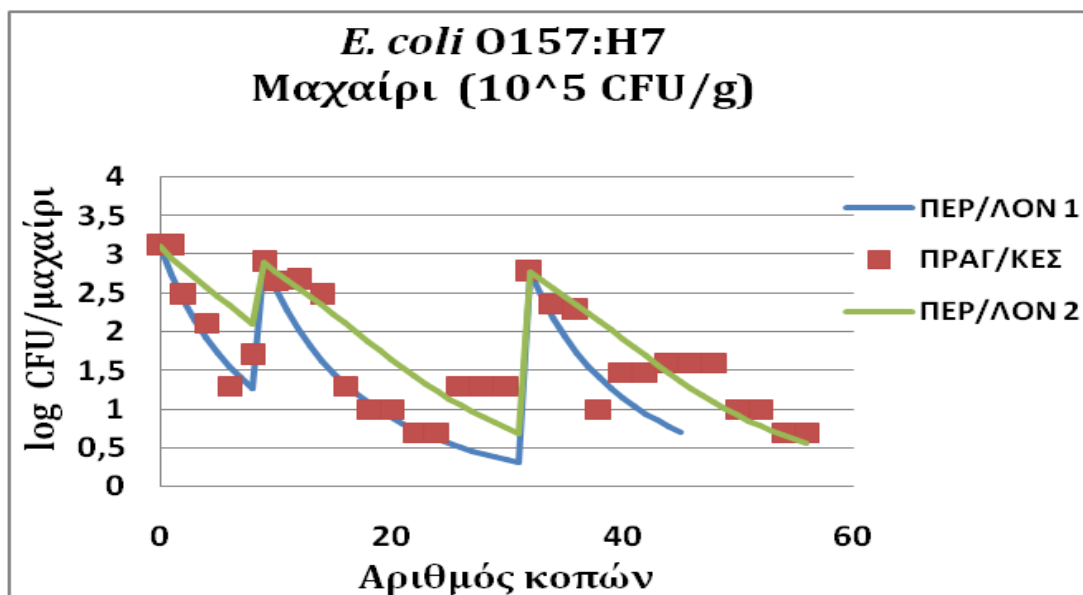
Bf	1,213852
Af	1,370851

Γράφημα 17 α, β, γ. Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *E. coli* O157:H7, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10³CFU/g) στην κοπή 23 κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίου μαχαιριού (β).

α



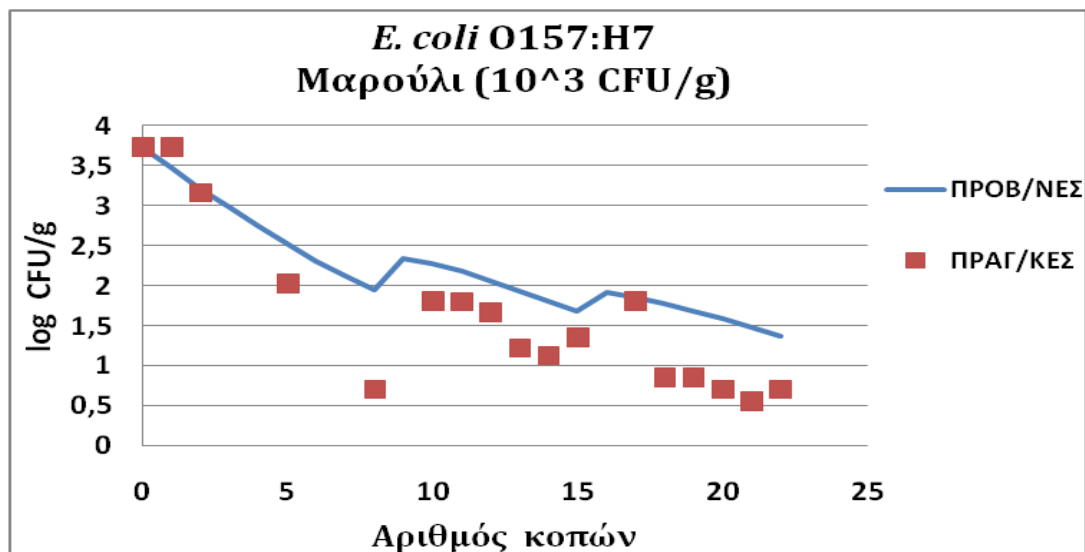
β



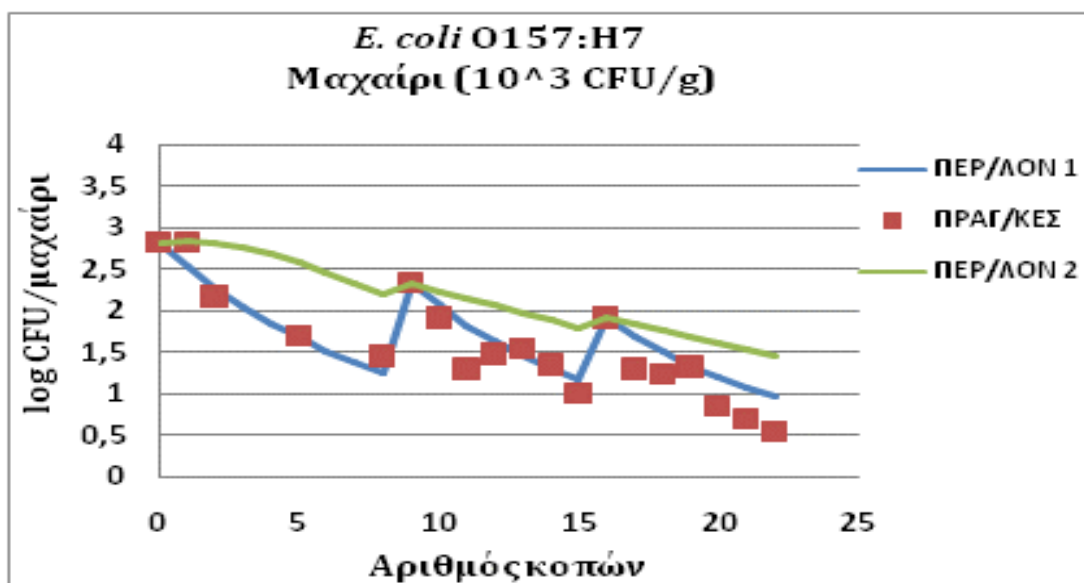
Bf	1,196165
Af	1,36822

Γράφημα 18 α, β, γ. Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *E. coli* O157:H7, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10⁵ CFU/g) στις κοπές 9 και 23 κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίου μαχαίριου (β).

α



β



Bf	1,506818
Af	1,519529

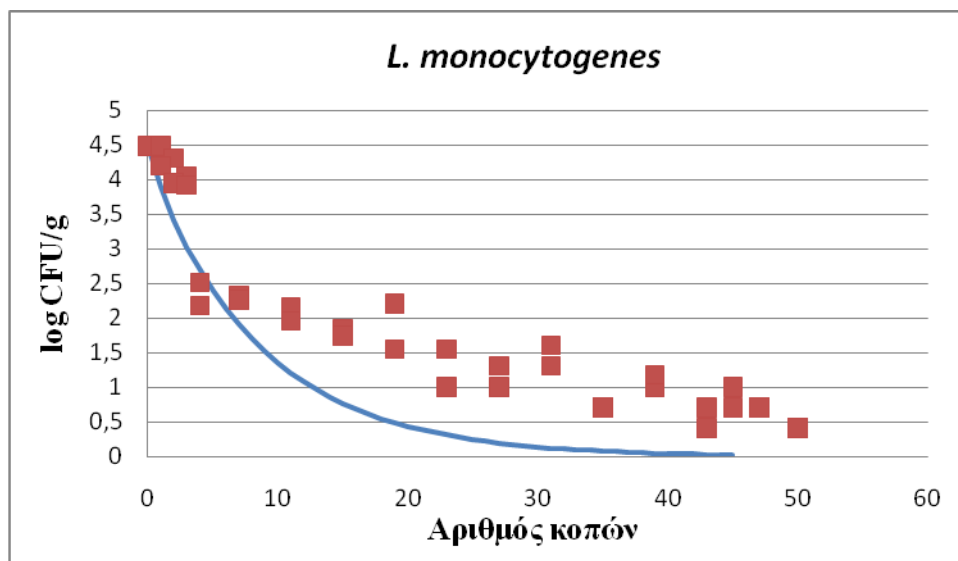
Γράφημα 19 α, β, γ. Αξιολόγηση του μοντέλου, με σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς του *E. coli* O157:H7, με τις προβλέψεις του μοντέλου για το υποπεριβάλλον (1) (—) της ταχείας μεταφοράς και το υποπεριβάλλον (2) (—) της βραδείας μεταφοράς, κατά το πείραμα επικύρωσης όπου παρεμβλήθηκε μολυσμένη παρτίδα μαρουλιού (10³ CFU/g) στις κοπές 9 και 16 κατά την διαδικασία κοπής ανεμβολίαστου μαρουλιού. Μεταφορά μικροβιακών κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι (α) και τελικό φέρον μικροβιακό φορτίου μαχαίριού (β).

Για τον έλεγχο της επίδοσης του μοντέλου υπολογίστηκαν οι συντελεστές **Bf** και **Af**, για την μεταφορά των κυττάρων στο μαρούλι. Οι τιμές των συντελεστών Bf και Af, υποδεικνύουν το ποσοστό συμφωνίας των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών (Ross, 1996), καθώς αποτελούν κριτήριο επικύρωσης του μοντέλου. Οι τιμές του συντελεστή Bf κυμαίνονται από 0,8 έως 1,5 ενώ του Af από 1,2 έως 1,5. Οι τιμές αυτές υποδεικνύουν μια ικανοποιητική συμφωνία μεταξύ των προβλεπόμενων και των παρατηρούμενων τιμών.

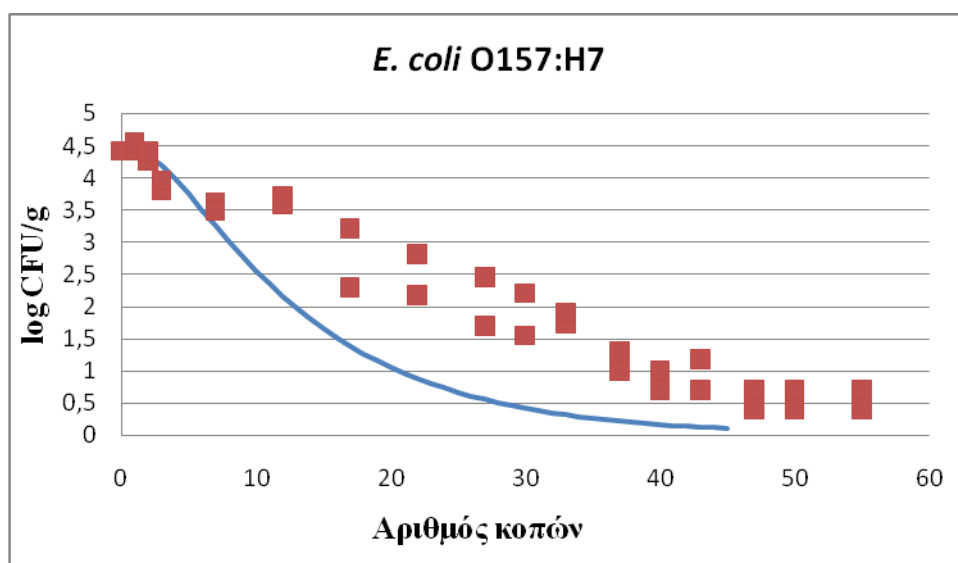
Παρατηρώντας και συγκρίνοντας τα γραφήματα διαπιστώνεται ότι το μοντέλο περνάει πιο κοντά από τις πραγματικές τιμές, σε εκείνες τις περιπτώσεις που έχει γίνει παρεμβολή με παρτίδα φύλλων μαρουλιού, εμβολιασμένη με 10^5 CFU/g. Αυτό αποδεικνύεται και από τις τιμές των Bf και Af, οι οποίες σε εκείνες τις περιπτώσεις τείνουν το 1, γεγονός το οποίο δείχνει καλύτερη πρόβλεψη συγκριτικά με εκείνες όπου έχει γίνει παρεμβολή με χαμηλό 10^3 CFU/g εμβόλιο.

Τέλος, τόσο από τα γραφήματα, όσο και από τις τιμές των συντελεστών Bf και Af, διαπιστώνεται ότι το μοντέλο προβλέπει με μεγαλύτερη ακρίβεια την μεταφορά των κυττάρων του *E. coli* O157:H7 όταν η επιμόλυνση, προέρχεται από μαχαίρι που φέρει υψηλό αριθμό κυττάρων (επιμόλυνση του μαχαιριού από παρτίδα μαρουλιού μολυσμένη με 10^5 CFU/g), συγκριτικά με το *L. monocytogenes*. Το αντίθετο συμβαίνει στις περιπτώσεις που η επιμόλυνση προέρχεται από μαχαίρι που φέρει χαμηλό αριθμό κυττάρων (επιμόλυνση του μαχαιριού από παρτίδα μαρουλιού μολυσμένη με 10^3 CFU/g).

Προκειμένου να αξιολογηθεί η καταλληλότητα του μοντέλου και για την εκτίμηση της μεταφοράς των υπό μελέτη παθογόνων από σκεύη κοπής σε διαφορετικά λαχανικά, παρτίδες των 30 g λάχανου τεμαχίστηκαν με την χρήση αυτοματοποιημένης συσκευής κοπής λαχανικών. Οι λεπίδες της συσκευής μολύνθηκαν προηγουμένως, από τεμαχισμό μολυσμένου λάχανου. Έτσι, κατά τον τεμαχισμό ανεμβολίαστου λάχανου παρατηρήθηκε, μέσω της διασταυρούμενης επιμόλυνσης, μεταφορά των κυττάρων του μικροοργανισμού (*L. monocytogenes* ή *E. coli* O157:H7) (Γραφήματα 20, 21).



Γράφημα 20. Σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς των κυττάρων *L. monocytogenes*, με τις προβλέψεις του μοντέλου (—), κατά τον τεμαχισμό λάχανου από αυτόματη συσκευή τεμαχισμού λαχανικών.



Γράφημα 21. Σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών (■) της μεταφοράς των κυττάρων *E. coli* O157:H7, με τις προβλέψεις του μοντέλου (—), κατά τον τεμαχισμό λάχανου από αυτόματη συσκευή τεμαχισμού λαχανικών.

Στα παραπάνω γραφήματα (Γραφήματα 20, 21), απεικονίζεται η σύγκριση των πειραματικά παρατηρούμενων τιμών μεταφοράς των κυττάρων *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7, με τις προβλέψεις του μοντέλου, κατά τον τεμαχισμό λάχανου

από αυτόματη συσκευή τεμαχισμού λαχανικών. Η συσκευή έχει αρχικά επιμολυνθεί από τεμαχισμό εμβολιασμένου λάχανου (10^5 log CFU/g).

Σε ότι αφορά τις πειραματικές τιμές και παρατηρώντας τα γραφήματα 20, 21, διαπιστώνεται παρόμοια εικόνα με τα γραφήματα που απεικονίζουν την μικροβιακή μεταφορά κυττάρων από το μαχαίρι στο μαρούλι κατά την διαδικασία διαδοχικών κοπών. Και στις δύο περιπτώσεις χειρισμού των λαχανικών παρατηρείται μια πτωτική τάση μεταφοράς των μικροβιακών κυττάρων. Η διαπίστωση ωστόσο (Γράφημα 21) της παρατεταμένης μεταφοράς και βραδύτερης μείωσης του *E. coli* O157:H7 μετά από μεγάλο αριθμό κοπών σε σχέση με το *L. monocytogenes* συμφωνεί με τις παρατηρήσεις που έγιναν για τα γραφήματα που αφορούν την μικροβιακή μεταφορά από μαχαίρι σε μαρούλι, κατόπιν διαδοχικών κοπών. Αυτό, όπως αναφέρεται και παραπάνω, οφείλεται στο γεγονός ότι ο *E. coli* O157:H7 είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, ενώ ο *L. monocytogenes* είναι Gram θετικό και έτσι διαφέρει η ένταση προσκόλλησης των δύο μικροοργανισμών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι παρόμοια με εκείνα που αναφέρθηκαν από τους Gram et al. (2006a), Vorst et al. (2006b), και Lin et al. (2006) τα οποία δείχνουν μια επαναλαμβανόμενη μεταφορά των κυττάρων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε αλλαντικά κατά τον τεμαχισμό τους από αυτοματοποιημένη μηχανή τεμαχισμού. Παρότι από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρατηρείται επαναλαμβανόμενη μεταφορά μικροβιακών κυττάρων στην περίπτωση κοπής λαχανικού με μαχαίρια, η δυναμικότητα μεταφοράς κυττάρων από μαχαίρι σε λαχανικό κατά την κοπή του και αντίστροφα, είναι πολύ διαφορετική από αυτήν του τεμαχισμού του λαχανικού από αυτόματη συσκευή, εξαιτίας της περιστροφικής κίνησης των λεπίδων. Όπως ανέφεραν οι Vorst et al., (2006b) η φυγόκεντρος δύναμη της περιστρεφόμενης λεπίδας και η μετ' έπειτα μεταφορά των μικροβιακών κυττάρων σε άλλα μέρη της αυτοματοποιημένης συσκευής τεμαχισμού (οπίσθια πλευρά, περιοχή συλλογής κ.α.), δεν παρατηρούνται κατά την κοπή ενός τροφίμου με μαχαίρι. Έτσι, παρατηρώντας τα γραφήματα 20, 21, διαπιστώνεται παρατεταμένη μεταφορά των μικροβιακών κυττάρων στην περίπτωση τεμαχισμού του λάχανου από την αυτόματη συσκευή τεμαχισμού λαχανικών, συγκριτικά με την μεταφορά που προκαλείται από το μαχαίρι στο μαρούλι. Αυτή η πορεία παρατηρείται τόσο στο βακτήριο *L. monocytogenes* όσο και στο *E. coli* O157:H7.

Επιπλέον, παρατηρώντας τα παραπάνω γραφήματα (Γραφήματα 20, 21), διαπιστώνεται ότι το μοντέλο έχει υποεκτιμήσει την μεταφορά των κυττάρων των δύο μικροοργανισμών. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην συσσώρευση μολυσμένων φυτικών υπολειμμάτων στην συσκευή. Έτσι, κατά την συλλογή του δείγματος μετά από κάθε κοπή, πιθανόν να συλλέγεται μέρος δείγματος από την προηγούμενη κοπή. Ακόμα, το είδος της φυλλικής επιφάνειας και η μικροδομή του λαχανικού επηρεάζει τα φαινόμενα προσκόλλησης και αποκόλλησης των κυττάρων σε αυτήν και κατ' επέκταση και τα φαινόμενα μεταφοράς.

Τέλος, από το γράφημα που απεικονίζει την ποσοτική μεταφορά κυττάρων *E. coli* O157:H7 παρατηρείται ο σχηματισμός ενός «πλατό» στις πρώτες κοπές, ακριβώς όπως σημειώθηκε παραπάνω για τα γραφήματα διαδοχικών κοπών με μαχαίρι. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζει και το μοντέλο που πρότειναν οι Møller et al. (2012) το οποίο περιγράφει την μεταφορά κυττάρων *Salmonella* Typhimurium DT104 σε χοιρινό κρέας κατά τον μηχανικό τεμαχισμό του.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης, συμπεραίνεται η σημαντικότητα τήρησης συνθηκών υγιεινής κατά την επεξεργασία των τροφίμων και ιδιαίτερα των ωμών λαχανικών. Τηρώντας τους απαραίτητους κανόνες υγιεινής αποφεύγεται η πιθανότητα πρόκλησης της διασταυρούμενης επιμόλυνσης, φαινόμενο το οποίο αποτελεί σημαντικό αίτιο τροφιμογενών λοιμώξεων, καθώς συναντάται σε μεγάλο βαθμό, τόσο στον οικιακό χώρο όσο και στα κέντρα μαζικής εστίασης και τις βιομηχανικές μονάδες.

Σημαντικό στοιχείο που διεξάγεται από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι η δυνατότητα εκτίμησης του βιολογικού κινδύνου κατά την προετοιμασία και τον χειρισμό των έτοιμων-προς-κατανάλωση σαλατών που αποτελούνται από πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Έχοντας πλέον μελετήσει τους παθογόνους μικροοργανισμούς *E. coli* O157:H7 και *L. monocytogenes*, μπορούμε να εκτιμήσουμε την συμπεριφορά τους στην μεταφορά κατά τις διάφορες περιπτώσεις διασταυρούμενης επιμόλυνσης.

Μελετώντας την επίδοση του μοντέλου που αναπτύχθηκε στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη καθώς και τους συντελεστές αξιολόγησής του, συμπεραίνουμε ότι είναι ένα δυναμικό μοντέλο που θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο «εργαλείο», ιδιαίτερα στην βιομηχανία, καθώς είναι ικανό να εκτιμήσει τον κίνδυνο κατά την προετοιμασία σαλατών με πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Επιπλέον, το εν λόγω μοντέλο, είναι ικανό να προβλέψει τις επιπτώσεις διαφορετικών σεναρίων διασταυρούμενης επιμόλυνσης, προς εξασφάλιση ασφαλών προϊόντων και κατ' επέκταση αποφυγής τροφιμογενών νοσημάτων. Ωστόσο, ανάγκη μικρής βελτίωσης χρήζει στις περιπτώσεις τεμαχισμού των λαχανικών με αυτοματοποιημένη συσκευή.

Μελλοντικά, προσδοκούμε να μελετηθεί η επίδραση, του χρόνου παραμονής των κυττάρων του μικροοργανισμού πάνω στο λαχανικό, στην μεταφορά τους από λαχανικά, φυλλώδη και μη, σε σκεύη κοπής τους, και το αντίστροφο, κατόπιν διαδοχικών κοπών και η δημιουργία ενός μοντέλου προσαρμοσμένου σε αυτά τα αποτελέσματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson, J.B., Shuster, T.A., Hansen, K.E., Levy, A.S., Volk, A. (2004). A camera's view of consumer food-handling behaviors. *J. Am. Diet. Assoc.* 104, 186-191.
- Austin, J.W., Doss, K.L., Blanchfield, B., and Farber, J.M. (1998). Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* on inoculated fresh-cut packaged vegetables. *J. Food Prot.* 61, 324–328.
- Babic, I., Roy, S., Watada, A.E., and Wergin, W.P. (1996). Changes in microbial populations on fresh cut spinach. *J. Food Microbiol.* 31,107–119.
- Beuchat, L.R., and Brackett, R.E. (1990). Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1734–1742.
- Beuchat, L.R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.* 59, 204-216.
- Beutin, L., Aleksic, S., Zimmermann, S. and Gleier, K. (1994). Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Med. Microbiol. Immun.* 183, 13–21.
- Brocklehurst, T.F., Zaman-Wong, C.M. and Lund., B.M. (1987). A note on the microbiology of retail packs of prepared salad vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 63, 409–415.
- CDC (1996). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection: Georgia and Tennessee, June 1995. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 45, 249–251.
- Christensen, B.B., Rosenquist, H., Sommer, H.M., Nielsen, N.L., Fagt, S., Andersen, N.L., et al. (2005). A model of hygiene practices and consumption patterns in the consumer phase. *Risk Analysis* 25, 49-60.
- Dourou, D., Beauchamp, C.S., Yoon, Y., Geornaras, I., Belk, K.E., Smith, G.C., Nychas, G.-J., Sofos, J.N. (2011). Attachment and biofilm formation by

- Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *Int. J. of Food Microbiol.*, 262-268.
- Ercolani, G.L. (1976). Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 847–852.
 - European Commission (2006). Health and food. Special Eurobarometer 246 / Wave 64.3 – TNS Opinion & Social. European Commission: Brussels.
 - Graves, T.K., Bradley, K.K., Crutcher, J.M. (1998). Outbreak of *Campylobacter enteritis* associated with cross-contamination of food-Oklahoma, Morbidity Mortality Weekly Rep.
 - Fischer, A.R.H., de Jong, A.E.I., van Asselt, E.D., de Jonge, R., Frewer, L.J., Nauta, M.J. (2007). Food safety in the domestic environment: an interdisciplinary investigation of microbial hazards during food preparation. *Risk Anal.* 27, 1065-1082.
 - Jackson, L.A., Keene, W.E., McAnulty, J.M., Alexander, E.R., Diermayer, M., Davis, M.A., Hedberg, K., Boase, J., Barrett, T.J., Samadpour, M., Fleming, D.W. (2000). Where's the beef? *Arch. Intern. Med.* 160, 2380-2385.
 - Harding, AH. (2008). Plasma vitamin C level, fruit and vegetable consumption, and the risk of new-onset type 2 diabetes mellitus: the European prospective investigation of cancer-Norfolk prospective study. *Archives of Internal Medicine* 168(14), 1493-1499.
 - Hoelzer, K., Pouillot, R., Gallagher, D., Silverman, M.B., Kause, J., Dennis, S. (2012). Estimation of *Listeria monocytogenes* transfer coefficients and efficacy of bacterial removal through cleaning and sanitation. *Int. J. of Food Microbiol.* 157, 267–277.
 - Hung, HC. (2004). Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J. of the National Cancer Institute* 96(21), 1577-1584.

- Ivanek, R., Gronh, Y.T., Wiedmann, M., & Wells, M.T. (2004). Mathematical model of *Listeria monocytogenes* crosscontamination in a fish processing plant. *J. of Food Prot.* 67, 2288-2297.
- Larson, A.E., Johnson, E.A., Barmore, C.R., and Hughes, M.D. (1997). Evaluation of the botulism hazard from vegetables in modified atmosphere packaging. *J. Food Prot.* 60, 1208–1214.
- Larson, A.E., Johnson, E.A., Barmore, C.R., and Hughes, M.D. (1997). Evaluation of the botulism hazard from vegetables in modified atmosphere packaging. *J. Food Prot.* 60, 1208–1214.
- Lin, C.M., Takeuchi, K., Zhang, L., Dohm, C.B., Meyer, J.D., Hall, P.A., and Doyle, M.P. (2006). Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69, 71–79.
- Manios, S.G., Konstantinidis, N., Gounadaki, A. S., Skandamis, P.N. (2013). 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 Predictive Modelling of Food Quality and Safety*, 318–327
- Matsos, A., Garland, J.L., and Fett, W.F. (2002). Composition and physiological profiling of sprout-associated microbial communities. *J. Food Prot.* 65, 1903–1908.
- Mermin, J., Mead, P., Gensheimer, K., Griffin, P. (1996). Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Among Boy Scouts in Maine. Abstract K44, p257. 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (New Orleans). *American Society of Microbiology, Washington, D.C.*
- Mirmiran, P. (2009). Fruit and vegetable consumption and risk factors for cardiovascular disease. *Metabolism* 58(4), 460-468.

- Møller C.O.A., Nauta M.J., Christensen B.B., Dalgaard P. and Hansen T.B. (2012). Modelling transfer of *Salmonella* Typhimurium DT104 during simulation of grinding of pork. *J. Applied Microbiol.* 112, 90-98.
- Nauta, M., van der Fels-Klerx, I. and Havelaar, A. (2005). A poultry-processing model for quantitative microbiological risk assessment. *Risk Anal.* 25, 85–98.
- Odumeru, J.A., Mitchell, S.J., Alves, D.M., Lynch, J.A., Yee, A.J., Wang, S.L., Styliadis, S., and Farber, J. (1997). Assessment of the microbiological quality of ready-to-eat vegetables for health-care food services. *J. Food Prot.* 60, 954–960.
- Pérez-Rodríguez F., Valero A., Todd E.C.D., Carrasco E., García - Gimeno R.M., Zurera G. (2007). Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product. *Meat Science*, 692-699.
- Pérez Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., Garcia, R.M., Zurera, G., (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology* 19, 131–144.
- Ravishankar, S., Zhu, L., Jaroni, D. (2010). Assessing the cross contamination and transfer rates of *Salmonella enterica* from chicken to lettuce under different food-handling scenarios. *Food Microbiology* 27, 791–794.
- Redmond, E.C., Griffith, C.J. (2003). Consumer food handling in the home: a review of food safety studies. *J. Food Prot.* 66, 130-161.
- Redmond, E.C., Griffith, C.J., Slader, J., and Humphrey, T.J. (2004). Microbiological and observational analysis of cross contamination risks during domestic food preparation. *British Food Journal* 106, 581-597.
- Rissanen, T.H. (2003). Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study. *J. of Nutrition* 133(1), 199-204.

- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J Appl Bacteriol* 81, 501–508.
- Schaffner, D. W. (2004). Mathematical frameworks for modeling *Listeria* cross-contamination in food-processing plants. *J. of Food Science*, 69, 155-159.
- Sheen, S. (2008). Modeling surface transfer of *Listeria monocytogenes* on salami during slicing. *J Food Sci* 73, E304–E311.
- Sheen, S. and Hwang, C. (2010). Mathematical modelling the cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of ready-to-eat meat product while slicing. *Food Microbiol* 27, 37–43.
- Silliker, J.H., (1980). *Microbial Ecology of Foods*, Vol. 2, Academic Press, New York.
- Skandamis, P.N., Stopforth, J.D., Ashton, L.V., Geornaras, I., Kendall, P.A., Sofos, J.N. (2009). *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. *Food Microbiology* 26, 112-119.
- Splittstoesser, D.F., Queale, D.T., Bowers, J.L., and Wilkison, M.. (1980). Coliform content of frozen blanched vegetables packed in the United States. *J. Food. Safety* 2, 1–11.
- Splittstoesser, D.F., Hervey II, G.E.R., and Wettergreen, W.P. (1965). Contamination of frozen vegetables by coagulasepositive staphylococci. *J. Milk Food Technol.* 28, 149–151.
- Sheen, S., Hwang, C.A. (2010). Mathematical modeling the cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of ready-to-eat meat product while slicing. *Food microbiology* 27, 37–43.
- Silva, S., Teixeira, P., Oliveira, R., Azeredo, J. (2008). Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *J. Food Prot.* 71, 1379-85.

- Splittstoesser, D.F., Wettergreen, W.P., and Pederson, C.S. (1961). Control of microorganisms during preparation of vegetables for freezing. I. Green beans. *Food Technol.* 15, 329–331.
- Valero, A., Hervas, C., Garcia- Gimeno, R.M. and Zurera, G. (2007) Searching for new mathematical growth model approaches for *Listeria monocytogenes*. *J Food Sci* 72, M16 – M25.
- Verhoeff-Bakkenes, L., Beumer, R.R., De Jonge, R., Van Leusden, R.M., de Jong, A.E.I. (2008). Quantification of *Campylobacter jejuni* cross-contamination via hands, cutlery, and cutting board during preparation of a chicken fruit salad. *J. Food Prot.* 71, 1018-1022.
- Vorst K.L., Todd E.C.D., Ryser E.T. (2006α) Transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of turkey breast, bologna, and salami with simulated kitchen knives. *J. Food Prot.* 69, 2939–2946
- Vorst, K., Todd, E.C.D., and Ryser, E.T. (2006b). Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. *J. Food Prot.* 69, 619–626.
- 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.
- Wachtel, M.R., McEvoy, J.L., Luo, Y., Williams-Campbell, A.M., Solomon, M.B. (2003). Cross-contamination of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with *Escherichia coli* O157:H7 via contaminated ground beef. *J. Food Prot.* 66, 1176-1183.
- World Cancer Research Fund (WCRF) Panel (2007). Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. *World Cancer Research Fund: Washington, DC*.

- Wachtel, M.R., Mcevoy, J.L., Luo, Y., William Campbell, A. M., & Solomon, M.B. (2003). Cross-contamination of lettuce by *Escherichia coli* O157:H7 via contaminated ground beef. *J. Food Prot.* 66, 1176-1183.
- Wilks, S.A., Michels, H.T., & Keevil, C.W. (2005). The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *Int. J. of Food Microbiology* 105, 445-454.
- Wilks, S.A., Michels, H.T., & Keevil, W. (2006). Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. *Int. J. of Food Microbiology* 111, 93-98.
- Yang, H., Mokhtari, A., Jaykus, L., Morales, R. A., Cates, S. C., & Cowen, P. (2006). Consumer phase risk assessment for *Listeria monocytogenes* in deli meats. *Risk Analysis*, 26, 89-103.
- Zhao, P., Zhao, T., Doyle, M.P., Rubino, J.R. and Meng, J. (1998). Development of a model for evaluation of microbial cross contamination in the kitchen. *J Food Protect* 61, 960–963
- <http://edocket.access.gpo.gov/2008/E8-19573.htm>
- <http://www.fightbac.org>
- <http://www.cdc.gov/>
- http://ec.europa.eu/index_el.htm
- http://www.colonista.com/my_weblog/2010/11/harmful-viruses-and-bacteria-lets-start-with-ecoli.html
- http://www.nsf.gov/news/news_summ.jsp?cntn_id=104283&preview=false
- <http://www.turbosquid.com/3d-models/microbes-micro-organisms-3d-model/644726>
- <http://cmapspublic3.ihmc.us/rid=1GS0545KF-Q1ZS64-2B0/Bacteriology>

- <http://clubfitnessblog.blogspot.gr/2011/11/reducing-cross-contamination-when.html>

