



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη επίδρασης βιοϋμενίων τροφιμογενών παθογόνων ως
παραγόντων διασταυρούμενης μόλυνσης σε οικιακό περιβάλλον**

ΕΛΕΝΗ Ν. ΓΚΑΝΑ

ΑΘΗΝΑ 2016

Γ.-Ι. ΝΥΧΑΣ (Επιβλέπων Καθηγητής)

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη επίδρασης βιοϋμενίων τροφιμογενών παθογόνων ως
παραγόντων διασταυρούμενης μόλυνσης σε οικιακό περιβάλλον**

ΕΛΕΝΗ Ν. ΓΚΑΝΑ

ΑΘΗΝΑ 2016

Γ.-Ι. ΝΥΧΑΣ (Επιβλέπων Καθηγητής)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη επίδρασης βιοϋμενίων τροφιμογενών παθογόνων ως παραγόντων διασταυρούμενης μόλυνσης σε οικιακό περιβάλλον

Ελένη Ν. Γκάνα

Κτηνίατρος, Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Msc, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, ΓΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ

Επιβλέπων Καθηγητής

Γεώργιος-Ιωάννης Ε. Νυχάς, Καθηγητής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Επίκουρος Καθηγητής

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευστάθιος Πανάγου, Επίκουρος Καθηγητής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος-Ιωάννης Ε. Νυχάς, Καθηγητής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Παναγιώτης Ν. Σκανδάμης, Επίκουρος Καθηγητής

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευστάθιος Ζ. Πανάγου, Επίκουρος Καθηγητής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κωνσταντίνος Π. Κουτσομανής, Αναπληρωτής Καθηγητής

Εργαστήριο Υγιεινής & Μικροβιολογίας Τροφίμων
Τμήμα Γεωπονίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Ελευθέριος Χ. Δροσινός, Καθηγητής

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Απόστολος Σ. Αγγελίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Εργαστήριο Ασφάλειας και Ποιότητας του Γάλακτος & των Προϊόντων του Τμήμα Κτηνιατρικής,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Χρυσάνθη Β. Παπαδοπούλου, Καθηγήτρια

Εργαστήριο Μικροβιολογίας,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προσομοίωση και η ποσοτικοποίηση σε εργαστηριακό επίπεδο φαινομένων διασταυρούμενης επιμόλυνσης που συχνά παρατηρούνται σε οικιακό ή περιβάλλον βιομηχανίας τροφίμων με την παράλληλη αναγνώριση παραγόντων που έχουν επίδραση στη μεταφορά των τροφιμογενών παθογόνων αποτελούν την επιστημονική βάση για την ανάλυση της επικινδυνότητας. Ο αρχικός σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση μέσω διαδικτυακής μελέτης, των αντιλήψεων, των γνώσεων και των αυτό- αναφερόμενων πρακτικών των καταναλωτών στην Ελλάδα που μπορεί να υπονομεύσουν την ασφάλεια των τροφίμων και να οδηγήσουν σε τροφιμογενείς λοιμώξεις (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3). Παράλληλα, προσδιορίστηκε η αναγνώριση κοινών τροφιμογενών παθογόνων από τους καταναλωτές και η συχνότητα καθώς επίσης και η πηγή τροφιμογενών λοιμώξεων κατά τους τελευταίους 12 μήνες. Οι γνώσεις ασφαλούς χειρισμού των τροφίμων επηρεάστηκαν κυρίως από το μορφωτικό επίπεδο και την επαγγελματική κατάσταση των καταναλωτών, ενώ δεν είχε επίδραση το φύλο, η ηλικία και η ύπαρξη τροφολοίμωξης τους τελευταίους 12 μήνες. Αν και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας η πλειοψηφία των καταναλωτών γνωρίζει τη σημασία της προσωπικής υγιεινής, του καθαρού οικιακού εξοπλισμού και της πρόληψης της διασταυρούμενης επιμόλυνσης κατά την διάρκεια προετοιμασίας γευμάτων, ωστόσο υπήρχε ποσοστό των ερωτηθέντων που υιοθετούσε λανθασμένες πρακτικές χειρισμού τροφίμων.

Εν συνεχεία, ποσοτικοποιήθηκε η μεταφορά κοινών τροφιμογενών παθογόνων (*S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 και *Listeria monocytogenes*) από τεχνητά επιμολυσμένο κρέας μέσω επιφανειών (ανοξείδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο) σε μη επιμολυσμένο κρέας (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όλοι οι παράγοντες που εξετάστηκαν (δηλ. είδος βακτηρίου, μέγεθος ενοφθαλμίσματος, τύπος της επιφάνειας και αριθμός διαδοχικού φιλέτου) είχαν επίδραση στο επίπεδο μεταφοράς των παθογόνων στα διαδοχικά φιλέτα, εκτός από το χρόνο επαφής. Συγκεκριμένα, η μεταφορά στα επόμενα φιλέτα ήταν ανάλογη με το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος, με φθίνουσα τάση από τα πρώτα στα τελευταία φιλέτα. Η επαφή με τις ξύλινες επιφάνειες οδήγησε σε υψηλότερη μεταφορά των παθογόνων στα επόμενα φιλέτα σε σχέση με το πολυαιθυλένιο και τον ανοξείδωτο χάλυβα. Όσον αφορά το είδος του παθογόνου, η *S. Typhimurium* φάνηκε να μεταφέρεται σε χαμηλότερο επίπεδο στα επόμενα φιλέτα σε σχέση με την *L. monocytogenes*, δηλαδή είχε την τάση να προσκολλάται καλύτερα στις επιφάνειες.

Σύμφωνα με το ερωτηματολόγιο, διάφορες πρακτικές καταγράφηκαν όσον αφορά τον καθαρισμό των επιφανειών επεξεργασίας τροφίμων και σημαντικό ποσοστό των καταναλωτών ισχυρίστηκαν ότι χρησιμοποιούν κοινούς πάγκους κοπής για, τρόφιμα ζωικής και φυτικής προέλευσης. Με

αφορμή αυτή την παρατήρηση και με γνώμονα τους παράγοντες που φάνηκε να επηρεάζουν την μεταφορά των παθογόνων, ο σκοπός της επόμενης μελέτης ήταν η μελέτη της μεταφοράς *S. Typhimurium* από βόεια φιλέτα σε ντομάτες μέσω επαφής με επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων (ανοξειδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο) και τεμαχισμού με μαχαίρι (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5). Επιπροσθέτως εφαρμόστηκαν διαδικασίες καθαρισμού και απολύμανσης που εφαρμόζονται σε οικιακό επίπεδο με σκοπό να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα τους (π.χ. μόνο νερό, νερό και απορρυπαντικό πιάτων, απολυμαντικό σπρέι). Τα δεδομένα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι το ξέπλυμα των επιφανειών μόνο με νερό δεν μείωσε τον πληθυσμό των βακτηρίων σε ασφαλή επίπεδα. Αντιθέτως, τόσο το πλύσιμο των επιφανειών με απορρυπαντικό πιάτων όσο κι η χρήση απολυμαντικού σπρέι ήταν αποτελεσματικοί μέθοδοι στην πρόληψη της διασταυρούμενης επιμόλυνσης μεταξύ κρέατος και λαχανικών, καθώς ο πληθυσμός των βακτηρίων στην πλαστική και την επιφάνεια του ανοξειδωτου χάλυβα ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης. Ωστόσο, το ίδιο δεν ισχύει για τη ξύλινη επιφάνεια, όπου δεδομένου της αδυναμίας επαρκούς καθαρισμού με όλες τις προαναφερόμενες μεθόδους, η χρήση τους θα πρέπει να αποφεύγεται.

Συνεπώς, συμπεραίνεται από τα παραπάνω ότι ένας σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με τα γεγονότα διασταυρούμενης επιμόλυνσης είναι τα παθογόνα κύτταρα που παραμένουν στις αβιοτικές επιφάνειες ως αποτέλεσμα ανεπαρκών διαδικασιών καθαρισμού και απολύμανσης. Εξαιτίας της πιθανής επεξεργασίας επιμολυσμένων πρώτων υλών, τα βακτήρια εναποτίθενται στις επιφάνειες και σχηματίζουν μικτά βιοϋμένια που αποτελούνται από διάφορα γένη, είδη ή και στελέχη μικροοργανισμών. Τα βιοϋμένια είναι ζωτικής σημασίας για την ασφάλεια των τροφίμων κι αφού εγκατασταθούν σε μια επιφάνεια πιθανόν να επιδεικνύουν αυξημένη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και στα απολυμαντικά προκαλώντας επανειλημμένα επεισόδια διασταυρούμενης επιμόλυνσης μέσω αποκόλλησης κυττάρων από τα εξωτερικά στρώματα του βιοϋμενίου. Σε αυτή τη μελέτη δυο στρατηγικές ελέγχου των βιοϋμενίων που βασίζονται στην πρόληψη σχηματισμού ή στην καταπολέμηση του ώριμου βιοϋμενίου, ελέγχθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Προς αυτή την κατεύθυνση προσδιορίστηκε ο σχηματισμός βιοϋμενίου *S. Typhimurium* και *S. aureus* (3 στελέχη έκαστο), υπό συνθήκες μονοκαλλιέργειας ή μικτής καλλιέργειας και η αποτελεσματικότητα 3 διαφορετικών απολυμαντικών (χλωριούχο βενζαλκόνιο, υπεροξικό οξύ, υποχλωριώδες νάτριο). Ο ανοξειδωτος χάλυβας όπου διενεργήθηκαν τα πειράματα και τα προαναφερόμενα απολυμαντικά χρησιμοποιούνται ευρέως σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων σε βιομηχανίες και χώρους μαζικής εστίασης (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπό συνθήκες μικτής καλλιέργειας παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο πληθυσμό και των δυο βακτηρίων σε σχέση με την μονοκαλλιέργεια ($P < 0,05$). Το χλωριούχο βενζαλκόνιο (50 ppm) ήταν το πιο αποτελεσματικό απολυμαντικό στη καταπολέμηση του βιοϋμενίου ανεξαρτήτως του

είδους της καλλιέργειας. Το χλωριούχο βενζαλκόνιο ήταν πιο αποτελεσματικό έναντι της *S. Typhimurium* σε σχέση με τον *S. aureus*, στις μονοκαλλιέργειες. Το υπεροξικό οξύ (10 ppm) παρουσίασε μεγαλύτερη διακύμανση της αποτελεσματικότητάς του έναντι του *S. aureus*, παρουσία της *S. Typhimurium*. Ενώ τόσο το βιοϋμένιο της *S. Typhimurium*, όσο και του *S. aureus* παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο υποχλωριώδες νάτριο (10 ppm). Η επικράτηση του κάθε στελέχους όσον αφορά το σχηματισμό βιοϋμένιου πριν και μετά την εφαρμογή του απολυμαντικού ελέγχθηκε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου, η οποία ανέδειξε διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης του κάθε στελέχους.

Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η πρόληψη της βακτηριακής προσκόλλησης και του σχηματισμού βιοϋμένιου μέσω της τροποποίησης των ιδιοτήτων της επιφάνειας. Για το σκοπό αυτό νανοεπιστρώσεις με βάση τις οργανοσιλάνες (ενώσεις διοξειδίου του πυριτίου/ SiO_2) που ενισχύουν την υδροφοβικότητα των επιφανειών ελέγχθηκαν έναντι στην προσκόλληση και τον σχηματισμό βιοϋμένιου παθογόνων (*S. aureus*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* O157:H7) σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα και γυάλινες (2 προϊόντα σε κάθε υλικό) (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7). Οι νανοεπιστρώσεις φάνηκαν να έχουν επίδραση στην βακτηριακή προσκόλληση ή/ και στον πληθυσμό του ώριμου βιοϋμένιου, ωστόσο η αποτελεσματικότητά τους εξαρτώταν άμεσα από το είδος των βακτηρίων και το υλικό των επιφανειών που χρησιμοποιήθηκαν. Για παράδειγμα, οι οργανοσιλάνες φάνηκε να επηρεάζουν την προσκόλληση και το σχηματισμό βιοϋμένιου (24 h) της *S. Typhimurium* τόσο στον ανοξειδωτο χάλυβα, όσο και στις γυάλινες επιφάνειες. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση στην προσκόλληση των κυττάρων του *S. aureus* στο γυαλί και της *E. coli* O157:H7 στον ανοξειδωτο χάλυβα, ενώ οι οργανοσιλάνες δεν είχαν καμία επίδραση ως προς την προσκόλληση και το σχηματισμό του βιοϋμένιου της *L. monocytogenes* ανεξαρτήτως χρόνου και υλικού επιφάνειας.

Συμπερασματικά, η παρούσα διδακτορική διατριβή υπογραμμίζει τη θετική επίπτωση στην ασφάλεια τροφίμων και κατά συνέπεια στη μείωση των τροφολοιμώξεων που μπορεί να έχει η υιοθέτηση και η εφαρμογή, από μέρους των καταναλωτών, ασφαλών πρακτικών χειρισμού τροφίμων και επαρκών διαδικασιών καθαρισμού/ απολύμανσης. Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε η βακτηριακή μεταφορά μεταξύ τροφίμων ζωικής προέλευσης ή ζωικής-φυτικής προέλευσης και αποδείχθηκε ότι αποτελεί μια πολυπαραγοντική διαδικασία που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και τις αλληλεπιδράσεις τους. Επιπλέον, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ ειδών και στελεχών βακτηρίων σε μικτά βιοϋμένια που πιθανόν να ανευρίσκονται σε χώρους επεξεργασίας τροφίμων, ως σημαντικός παράγοντας κατά τη διασταυρούμενη επιμόλυνση. Τέλος, εκτιμήθηκε η αποτελεσματικότητα απολυμαντικών και νανοεπιστρώσεων ως κύριες στρατηγικές πρόληψης και

καταπολέμησης των βιοϋμενίων παθογόνων μικροοργανισμών.

Λέξεις κλειδιά: βιοϋμένια, τροφιμογενή παθογόνα, διασταυρούμενη επιμόλυνση, απολυμαντικά, καταναλωτές, νανο-επιστρώσεις

ABSTRACT

Quantification of common cross-contamination scenarios encountered in households and identification of the factors that may affect the transfer of foodborne bacteria through contact surfaces provides a scientific basis for risk management. The initial aim of this study was to investigate, through an online survey, Greek consumer's attitudes, opinions and self-reported practices during food handling that may compromise food safety and lead to foodborne illnesses. In the meantime, the acknowledgment on behalf of the tested consumers of common foodborne pathogens and the prevalence of foodborne illness during the last 12 months was determined (CHAPTER 3). The educational level and employment status seemed to influence the acknowledgment of consumers concerning food safety, however gender, age and incidence of foodborne illness during the last 12 months had no impact.

Although, according to the survey findings, the majority of consumers acknowledge the importance of personal hygiene, decontamination of kitchen equipment, food preparation and prevention of cross contamination, a considerable proportion of the participants also admit the embracement of inappropriate food-handling practices. Given the above, the transfer potential of common foodborne pathogens (*Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*) from contaminated raw meat through various surfaces (i.e. stainless steel, polyethylene and wooden) to other food of animal- or plant origin was assessed (CHAPTER 4). Results revealed that all the factors examined, i.e. the bacterial species, the size of initial inoculum, the contact time, the type of surface and the number of fillet influenced the degree of transfer of pathogens to subsequent fillets. All non-inoculated fillets were contaminated with a progressive reduction trend in pathogen population levels from the inoculated fillets to the sixth non-inoculated ones that got in contact with the surfaces, regardless of the initial inoculum. Wooden surfaces enhanced the transfer of bacteria to subsequent fillets compared with other materials after 15 min of contact. *S. Typhimurium* was transferred at lower rates to contaminated fillets than *E. coli* O157:H7, followed by *L. monocytogenes*.

According to the consumers' survey, various practices and attitudes towards washing of food contact surfaces have been recorded among different individuals and a considerable proportion of the participants admitted the use of common cutting boards for raw meat and fresh produce. Hence, taking into consideration the main factors that affect bacterial transfer, the objectives of the next study were to investigate *S. Typhimurium* cross-contamination from inoculated beef fillets to

tomatoes through cutting boards and knives (i) without intermediate cleaning of kitchen equipment and (ii) under three decontamination scenarios that may be practiced in households: rinsing only with tap water, washing/scrubbing with detergent and using a commercial antibacterial product (CHAPTER 5). Data derived from this study revealed that rinsing only with tap water was not able to reduce the bacterial load to safe levels. On the other hand, thorough mechanical washing of surfaces with water and detergent turned out to be efficient in considerably reducing cross-contamination between raw meat and fresh produce, at least with regard to polyethylene and stainless steel surfaces. With particular reference to the surfaces' materials, given their difficult decontamination and the potentially high transfer of pathogens to biotic surfaces, as illustrated by the results of this study, the use of wooden cutting boards should be avoided.

Based on the aforementioned discussion, it is concluded that a significant factor associated with cross contamination events in the domestic environment is the remaining population of pathogenic cells on abiotic surfaces, following inadequate cleaning and disinfection procedures. During the processing of contaminated raw materials bacteria may deposit to surfaces and form multispecies biofilms. Biofilms are one of the major issues related to food safety concerns and once established, biofilms generally exhibit increased resistance to antimicrobials, thus creating the potential for reoccurring contamination events as outer layers of the biofilm slough off into the surrounding environment. In this study two strategic approaches were evaluated to confront biofilms: prevention and eradication. Materials that change surface properties is a way to prevent attachment and reduce the formation or enhance the dispersion of biofilm, while the use of disinfecting agents is a way to eradicate already formed biofilms. To this direction, the characterization of the biofilm formation of *S. Typhimurium* and *S. aureus* (3 strains each) was evaluated on stainless steel surfaces, under mono and dual-species conditions. In addition, the efficacy of 3 different chemical antimicrobial compounds (benzalkonium chloride, BC, peroxyacetic acid, PAA and sodium hypochlorite, NaClO) was investigated (CHAPTER 6). Results showed that dual-species conditions lead to a significant reduction in the number of sessile cells, compared to mono-species conditions. Regarding the disinfection resistance, in general BC was found to be more effective in both mono- and dual-species biofilm communities. BC was more effective against *S. Typhimurium* than *S. aureus* biofilm concerning monoculture conditions. The effectiveness of PAA was highly varied against *S. aureus*, in mixed-culture conditions with *S. Typhimurium*. Treatment with NaClO was not effective in eliminating both sessile communities under mono/dual cultures. The dominance of each strain in the sessile communities was monitored by PFGE that interestingly revealed different strain prevalence, regarding biofilm formation ability and antimicrobial resistance.

Furthermore, nano-coatings based on organosilanes that enhance hydrophobicity of

surfaces were tested against common foodborne bacteria (*S. aureus*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* O157:H7) attachment and subsequent biofilm formation on stainless steel and glass surfaces (CHAPTER 7). Organosilane-based products seemed to affect bacterial attachment on the inert surfaces and/or subsequent biofilm formation, but it was highly dependent on the species and the surface material involved. According to our results, organosilanes eliminated the adherence (3 h) and bifilm formation (24 h) of *S. Typhimurium* both at modified glass and stainless steel surfaces. Significant higher cell population of *S. aureus* (*glass*) and *E.coli* O157:H7 (stainless steel) were attached on surfaces modified with organosilanes compared to controls. Organosilanes had no effect on eliminating *L. monocytogenes* attached cells nor biofilm formation.

Overall, the present Thesis highlights the positive impact on food safety following consumers' adoption and implementation of safe practices during food preparation and adequate subsequent cleaning/disinfection procedures. Bacterial transfer was also determined as a multi-factor process that was directly depended on many endogenous and exogenous factors and their interactions. Furthermore, an insight into multispecies/multistrains biofilm interactions, as an important factor during cross-contamination phenomena was obtained. Finally, the evaluation of efficacy of important strategies (disinfectants, nano- coatings) against bacterial attachment and biofilm formation was determined.

Keywords: biofilms, foodborne pathogens, cross-contamination, disinfectants, consumers, nano-coatings

Ευχαριστίες

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή της διδακτορικής μου διατριβής, κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά, για την πολύτιμη βοήθεια, τις χρήσιμες συμβουλές, την καθοδήγησή του και την επίλυση των όποιων προβλημάτων προέκυψαν κατά τη διάρκεια της έρευνας μου. Θα ήθελα να εκφράσω την βαθιά μου ευγνωμοσύνη που μου έδωσε τη δυνατότητα να διεξάγω την διατριβή μου στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, αποδεικνύοντας έμπρακτα τις απόψεις του για τη διεπιστημονικότητα και τη συμπληρωματικότητα των επιστημονικών κλάδων. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη στήριξη και την κατανόησή του στην επιλογή μου να συνδυάσω την μητρότητα και τις σπουδές. Είμαι ευγνώμων γιατί μου έδωσε τη δυνατότητα να αναλάβω πρωτοβουλίες και να επιτυγχάνω νέους στόχους όσο δύσκολοι κι αν φαίνονται εξ' αρχής.

Επίσης, είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής εργασίας μου, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σκανδάμη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Πανάγου, για την τιμή που μου έκαναν να κρίνουν τη διδακτορική μου διατριβή και για την καθοδήγησή τους. Επίσης οφείλω ευχαριστίες στους καθηγητές της επταμελούς επιτροπής, στον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Κουτσουμανή για τις σημαντικές υποδείξεις του με σκοπό τη βελτίωση της διατριβής και την εμπάθυση των γνώσεων μου, στον Καθηγητή κ. Δροσινό για την καθοδήγησή του για την εφαρμογή των αποτελεσμάτων της έρευνας και την Καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου για τις πολύτιμες διορθώσεις της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Αγγελίδη, που είχα την τιμή να τον γνωρίζω και σε προπτυχιακό επίπεδο και αποτέλεσε έμπνευση μου για την κατεύθυνση προς τη μικροβιολογία τροφίμων, για την προσεκτική ανάγνωση της διατριβής μου και για τις σημαντικές διορθώσεις/βελτιώσεις του κειμένου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα κ. Δουλγεράκη για την αστείρευτη παροχή επιστημονικής γνώσης, για την εκμάθηση τεχνικών, για τη ηθική υποστήριξη της και τις συμβουλές της, ανεξαρτήτως ημέρας και ώρας. Επίσης, της χρωστάω ευγνωμοσύνη για την άψογη συνεργασία μας στα πλαίσια της υποτροφίας του ιδρύματος Λάτση «Επιστημονικές Μελέτες 2015» από την υποβολή της πρότασης και τη διεξαγωγή των πειραμάτων έως και την τελική αναφορά. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τη βοήθεια της στην εκμάθηση της συγγραφής επιστημονικών άρθρων και τις σημαντικές διορθώσεις στα draft (απολυμάνσεων και νανοεπιστρώσεων βιουμενίων). Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εντεταλμένο ερευνητή κ. Χωριανόπουλο για την

ένταξη μου στην πειραματική διαδικασία και για την αμέριστη βοήθεια του, δείχνοντας μου έμπρακτα την αξία της συνεργασίας. Τα πειράματα που διεξάγαμε υπό την καθοδήγηση του ήταν η καλύτερη δυνατή εμπειρία για εμένα στο ξεκίνημα της διατριβής μου. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις διορθώσεις στο draft της μεταφοράς τροφιμογενών παθογόνων.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα κ. Λιανού για τις πολύτιμες διορθώσεις τις στο draft με τη διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ τροφίμων ζωικής και φυτικής προέλευσης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γκιαούρη για την πολύ σημαντική βοήθεια του στη βελτίωση και τη διόρθωση του draft των απολυμάνσεων των βιουμενίων. Η ευγνωμοσύνη μου και για τους δυο είναι μεγάλη, καθώς ο χρόνος και ο κόπος που διέθεσαν σε εμένα, τον στέρησαν από τις οικογένειες τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Τρυφινοπούλου για την υποστήριξη της από την πρώτη μέρα που ήρθα στο εργαστήριο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σταματίου για την διεκπεραίωση πάσης φύσεως οικονομικών και διοικητικών θεμάτων κατά την διάρκεια των σπουδών μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα κ. Μπλάνα για την βοήθεια της και τις συμβουλές της σε εργαστηριακά θέματα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδάκτορα κ. Νατσκούλη για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε όσον αφορά τις βασικές αρχές της μυκητολογίας και τη συνεργασία μας σε πειράματα βιουμενίων μυκήτων. Ευχαριστώ τον κ. Ηλιόπουλο και την κ. Χονδροδήμου για τη βοήθεια τους σε θέματα του εργαστηρίου και τη άποψη συνεργασία μας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την μεταδιδάκτορα κ. Παπαδοπούλου και την διδάκτορα κ. Γρούντα για την βοήθεια τους στην ομαλή ένταξη μου στον εργαστηριακό χώρο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Λήδα Λάππα για τη συνεργασία μας σε μικτά βιουμείνια βακτηρίων – μυκήτων, στα πλαίσια του οποίου ευχαριστώ και τον Καθηγητή κ. Φασέα για την εκμάθηση του μικροσκοπίου SEM. Ευχαριστώ τους συναδέλφους μου και υποψήφιους διδάκτορες Έφη Κογκάκη, Αναστασία Λύτου, Ματούλα Μπονάτσου και Δημήτρη Παυλίδη για την άποψη συνύπαρξη μας στο εργαστήριο, για την κατανόηση τους και την υποστήριξη τους, δημιουργώντας ένα φιλικό και ευχάριστο περιβάλλον εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια του διαγωνισμού καινοτομίας «Ecotrophelia 2016». Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου του Ποιοτικού Ελέγχου για την πρακτική τους υποστήριξη και ιδιαίτερα την κ. Μπικούλη και την κ. Γαβριήλ για την σημαντική ανταλλαγή επιστημονικών γνώσεων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Davide Sardella για την συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια της μετακίνησης του (BacFoodNet), όσον αφορά τα αλληλεπιδράσεις μικτών

βιουμενίων βακτηρίων-μυκήτων που ανιχνεύονται στις επιφάνειες αχλαδιού.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Χαδιώ και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ζωΐδη, επειδή παρότι έχουν περάσει οκτώ χρόνια από την ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού μου συνεχίζουν να με στηρίζουν και να με εμπνέουν. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα εργαστηριακά μου «παιδιά» Κυριακή Βάβουλα, Ειρήνη Κανδαράκη, Αθηνά Αντουβά, Μαρία- Εμμανουέλα Κασσαλία, Αναστάση Βοργιά και Κωνσταντίνο Δεντόπουλο, που είχα την χαρά να συνεργαστώ μαζί τους, στα πλαίσια των πτυχιακών και μεταπτυχιακών διατριβών τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Ι. Λάτση για την ετήσια υποτροφία στις «Επιστημονικές μελέτες 2015» και το πρόγραμμα του BacFoodNet (Cost Action FA1202) για τα μετεκπαιδευτικά σεμινάρια «Hands-on course in advanced techniques to study food-biofilms» και «Microarray Technologies For Food Safety Applications».

Ευχαριστώ τους γονείς μου, Νικόλαο και Τριανταφυλλιά και την αδερφή μου Ολυμπία για την αγάπη και υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης, είμαι ευγνώμων για τον σύζυγο μου Δημήτρη Κοντογεώργη και τον γιο μου Κωνσταντίνο για την κατανόησή τους και την αγάπη τους, καθόλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Χωρίς την αμέριστη βοήθεια και φροντίδα τους δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Τους χρωστώ πολλά περισσότερα από όσα μπορώ να εκφράσω με λόγια και το ελάχιστο που μπορώ να ανταποδώσω είναι να τους αφιερώσω αυτή τη διατριβή με όλη μου την αγάπη.

*Αν σας συμπεριφέρθηκα καλά, συμπεριφερθείτε καλά και στους επόμενους.
Αν δεν σας συμπεριφέρθηκα καλά, εσείς να συμπεριφερθείτε καλά στους επόμενους.*

N.A. Κοκόλης, Αείμνηστος Καθηγητής Τμήματος Κτηνιατρικής, ΑΠΘ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ix
ABSTRACT.....	xiii
Ευχαριστίες.....	xvii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	1
Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	1
Τροφιμογενείς λοιμώξεις και παθογόνοι μικροοργανισμοί	2
 Τροφιμογενείς λοιμώξεις.....	2
Τροφιμογενή παθογόνα	5
<i>Salmonella enterica</i>	5
Χαρακτηριστικά.....	5
Κλινικές εκδηλώσεις	6
Επιδημιολογία.....	7
Συσχετισμός με τρόφιμα.....	7
<i>Escherichia coli</i>	7
Χαρακτηριστικά.....	7
Κλινικές εκδηλώσεις	8
Επιδημιολογία.....	9
Συσχετισμός με τρόφιμα.....	9
<i>Yersinia spp.</i>	9
Χαρακτηριστικά.....	10
Κλινικές εκδηλώσεις	10
Επιδημιολογία.....	10
Συσχετισμός με τρόφιμα.....	11
<i>Listeria monocytogenes</i>	12
Χαρακτηριστικά.....	12
Κλινικές εκδηλώσεις	13
Επιδημιολογία.....	14
Συσχετισμός με τρόφιμα.....	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	15
Χαρακτηριστικά παθογόνου	15
Κλινικές εκδηλώσεις	15

Επιδημιολογία.....	16
Συσχετισμός με τρόφιμα.....	17
Ηλεκτροφόρηση Εναλλασσόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE).....	18
Διασταυρούμενη επιμόλυνση.....	19
Διασταυρούμενη επιμόλυνση σε οικιακό επίπεδο.....	19
Διασταυρούμενη επιμόλυνση σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.....	20
Ο ρόλος της διασταυρούμενης επιμόλυνσης στη μετάδοση τροφιμογενών λοιμώξεων.....	22
Ανάλυση επικινδυνότητας διασταυρούμενης επιμόλυνσης.....	23
Συχνότητα επιμόλυνσης σε οικιακό περιβάλλον.....	23
Ανάλυση αναγκαιότητας απολύμανσης.....	24
Παράγοντες που επηρεάζουν τη διασταυρούμενη επιμόλυνση.....	24
Εξωγενείς παράγοντες.....	25
Ενδογενείς παράγοντες.....	26
Πρόληψη διασταυρούμενης επιμόλυνσης.....	27
Μείωση του μικροβιακού φορτίου σε οικιακό περιβάλλον.....	29
Στέγνωμα επιφανειών.....	29
Χρήση χημικών απολυμαντικών.....	30
Βιοϋμένια.....	31
Κύκλος ζωής βιοϋμενίου.....	32
Προσκόλληση κυττάρων.....	32
Στάδια προσκόλλησης κυττάρων.....	32
Α) Σχηματισμός conditioning film.....	32
Β) Αντιστρεπτή προσκόλληση.....	32
Γ) Μη αντιστρεπτή προσκόλληση.....	34
Παράγοντες που επηρεάζουν την προσκόλληση των παθογόνων σε επιφάνειες τροφίμων.....	35
Ο τύπος της επιφάνειας.....	35
Το στέλεχος του βακτηρίου.....	36
Θερμοκρασία.....	37
Προεμπλουτισμός επιφάνειας με θρεπτικές ουσίες (Conditioning film).....	38
Μικτές καλλιέργειες.....	39
Σχηματισμός ώριμου βιοϋμενίου.....	39
Διασπορά βιοϋμενίου.....	40
Βιοϋμένια σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων.....	41
Στρατηγικές ελέγχου των βιοϋμενίων.....	43
Πρόληψη του σχηματισμού βιοϋμενίων.....	43

Καταπολέμηση των βιοϋμενίων με απολυμαντικά	44
Ομάδες απολυμαντικών και μηχανισμός δράσης	45
A) Χλώριο και παράγωγα χλωρίου	45
B) Υπεροξειδία	45
Γ) Παράγωγα τεταρτοταγούς αμμωνίου	46
Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του απολυμαντικού ενάντια στα βιοϋμενία	46
Η μειωμένη διείσδυση των βιοκτόνων στο βιοϋμένιο	47
Ο φαινότυπος των βιοϋμενικών κυττάρων	48
Η παρουσία προσαρμοσμένων στα απολυμαντικά και επιμενότων κυττάρων	49
Προστασία των παθογόνων σε μικτά βιοϋμενία	50
Σκοπός της διατριβής.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	53
Υλικά και μέθοδοι	53
Παθογόνοι μικροοργανισμοί της παρούσας μελέτης	54
Θρεπτικά υποστρώματα και συνθήκες επώασης.....	55
Μεθοδολογία έρευνας	55
Ηλεκτροφόρηση Εναλλασσόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)	56
Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε βοθρία πολυστυρενίου.....	59
Σχηματισμός βιοϋμενίου	59
Χρώση βιοϋμενίου με κρυσταλλικό ιώδες (Crystal Violet) και ποσοτικοποίηση βιοϋμενίου με μέτρηση οπτικής πυκνότητας.....	59
Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα και γυάλινες.....	61
Καθαρισμός επιφανειών.....	61
Σχηματισμός βιοϋμενίου	61
Ποσοτικοποίηση βιοϋμενίου	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	65
Μελέτη της γνώμης και της γνώσης των Ελλήνων καταναλωτών ως προς τον ασφαλή χειρισμό τροφίμων	65
Εισαγωγή.....	66
Σκοπός μελέτης.....	67
Μεθοδολογία.....	68
Ερευνητικό εργαλείο συλλογής δεδομένων.....	68
Εγκυρότητα και αξιοπιστία της έρευνας	69
Ανάλυση δεδομένων.....	69
Ερωτηματολόγιο	73

Δημογραφικά στοιχεία	73
Γνώσεις- Απόψεις σε θέματα ασφάλειας τροφίμων	75
Εννοιολογική κατασκευή Α «Συσχέτισης τροφίμων- μικροοργανισμών».....	75
Εννοιολογική κατασκευή Β «Ασφάλεια επιφανειών, οικιακού εξοπλισμού»	76
Εννοιολογική κατασκευή Γ «Συντήρησης τροφίμων»	76
Κατά δήλωση πρακτικές χειρισμού	77
Εννοιολογική κατασκευή Δ «Διασταυρούμενη επιμόλυνση».....	77
Αποτελέσματα και συζήτηση.....	78
Δημογραφικά χαρακτηριστικά των καταναλωτών	78
Γνώσεις- Απόψεις σε θέματα ασφάλειας τροφίμων	87
Εννοιολογική κατασκευή Α «Συσχετισμός τροφίμων-μικροοργανισμών»	87
Εννοιολογική κατασκευή Β «Ασφάλεια επιφανειών-οικιακού εξοπλισμού»	89
Εννοιολογική κατασκευή Γ «Συντήρηση τροφίμων».....	92
Εννοιολογική κατασκευή Δ «Διασταυρούμενη επιμόλυνση».....	93
Ερωτήσεις αυτό-αναφερόμενων πρακτικών.....	95
Διερεύνηση προσωπική υγιεινής	95
Διερεύνηση διαχωρισμού (διασταυρούμενης- επιμόλυνσης).....	97
Διερεύνηση διατήρησης αλυσίδας ψύχους	98
Συγκρίσεις μεταξύ ερωτήσεων	100
Σύγκριση της πιθανότητας τροφιμογενούς λοίμωξης με δημογραφικά στοιχεία	100
Συγκρίσεις μεταξύ εννοιολογικών κατασκευών.....	101
Συνολική βαθμολογία	102
Συμπεράσματα.....	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	107
Μεταφορά των τροφιμογενών παθογόνων <i>S. Typhimurium</i> , <i>L. monocytogenes</i> και <i>E. coli</i> O157:H7 από επιμολυσμένα βόεια φιλέτα διαμέσου επιφανειών τροφίμων σε μη επιμολυσμένα βόεια φιλέτα.....	107
Εισαγωγή.....	108
Σκοπός μελέτης.....	109
Υλικά και μέθοδοι.....	109
Βακτηριακά στελέχη	109
Επιφάνειες και δείγματα	109
Πειραματικός σχεδιασμός	110
Μικροβιακές αναλύσεις.....	110
Ανάλυση δεδομένων.....	110

Αποτελέσματα- Συζήτηση	112
Επίδραση του αριθμού του φιλέτου	112
Επίδραση του είδους του βακτηρίου	113
Επίδραση του τύπου της επιφάνειας	115
Επίδραση του επιπέδου ενοφθαλμισμού	115
Επίδραση του χρόνου επαφής.....	116
Συμπεράσματα.....	117
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	125
Διασταυρούμενη επιμόλυνση <i>S. Typhimurium</i> από βόεια φιλέτα σε ντομάτες διαμέσου οικιακού εξοπλισμού και επίδραση κοινών τρόπων καθαρισμού και απολύμανσης	125
Εισαγωγή.....	126
Σκοπός μελέτης	127
Υλικά και μέθοδοι	128
Βακτηριακά στελέχη	128
Επιφάνειες και δείγματα	128
Πειραματικός σχεδιασμός	128
Μικροβιακές αναλύσεις.....	129
Ανάλυση δεδομένων.....	129
Αποτελέσματα και συζήτηση.....	131
Διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ βιοτικών και αβιοτικών επιφανειών χωρίς ενδιάμεσο καθαρισμό/ απολύμανση	131
Αποτελεσματικότητα καθαρισμού επιφανειών και μαχαιριών με νερό	133
Αποτελεσματικότητα μηχανικού καθαρισμού επιφανειών και μαχαιριών με νερό και απορρυπαντικό	133
Αποτελεσματικότητα απολύμανσης επιφανειών και μαχαιριών με αντιβακτηριδιακό σπρέι	134
Επίπεδα μεταφοράς (%)	135
Συμπεράσματα.....	137
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	139
Ανάπτυξη βιοϋμενίου μονο-καλλιιεργειών και μικτών καλλιιεργειών <i>S. Typhimurium</i> και <i>S. aureus</i> . Μελέτη της αντιβακτηριακής επίδρασης κοινών απολυμαντικών στα βιοϋμένια και προσδιορισμός του κάθε στελέχους με PFGE.....	139
Εισαγωγή.....	140
Σκοπός μελέτης	142
Υλικά και μέθοδοι	142
Βακτηριακά στελέχη	142
Σχηματισμός βιοϋμενίων	143
Απολύμανση βιοϋμενίων.....	143

Ποσοτικοποίηση βιοϋμενίου	143
Ηλεκτροφόρηση Εναλλασσόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)	143
Ανάλυση δεδομένων.....	145
Αποτελέσματα και συζήτηση.....	145
Επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας (μονής/μικτής) στο σχηματισμό βιοϋμενίου <i>S. Typhimurium</i> και <i>S. aureus</i>	145
Επίδραση της απολύμανσης στον πληθυσμό βιοϋμενικών κυττάρων των <i>S. Typhimurium</i> και <i>S. aureus</i>	148
Κατανομή των στελεχών της <i>S. Typhimurium</i> και <i>S. aureus</i> ανά συνθήκη καλλιέργειας και απολύμανσης.....	152
Συμπεράσματα.....	153
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	155
Επίδραση υπερ-υδρόφοβης επίστρωσης σε μεταλλικές και γυάλινες αβιοτικές επιφάνειες στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων <i>S. Typhimurium</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> , <i>Y. enterocolitica</i> και <i>S. aureus</i>	155
Εισαγωγή.....	156
Σκοπός μελέτης.....	159
Υλικά και μέθοδοι.....	159
Βακτηριακά στελέχη	159
Προϊόντα και εφαρμογή υπερ- υδρόφοβης επίστρωσης.....	159
Συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίου	161
Ανάλυση δεδομένων.....	163
Αποτελέσματα και συζήτηση.....	163
Σχηματισμός βιοϋμενίου σε βοθρία πολυστυρενίου.....	163
Σχηματισμός βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα και γυαλιού.....	166
Επίδραση των επιστρώσεων οργανοσιλανών στο σχηματισμό βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα και γυαλιού.....	168
Συμπεράσματα.....	173
Γενικά συμπεράσματα	175
Μελλοντικές προτάσεις.....	177
Βιβλιογραφία	179
Παράρτημα Α	217
Ευρετήριο εικόνων.....	217
Ευρετήριο διαγραμμάτων.....	218
Ευρετήριο πινάκων	220

Παράρτημα Β	223
Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά άρθρα με κριτές.....	223
Συμμετοχές σε συνέδρια- ημερίδες.....	225
α) Προφορικές ανακοινώσεις:.....	225
β) Αναρτημένες ανακοινώσεις:.....	227

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

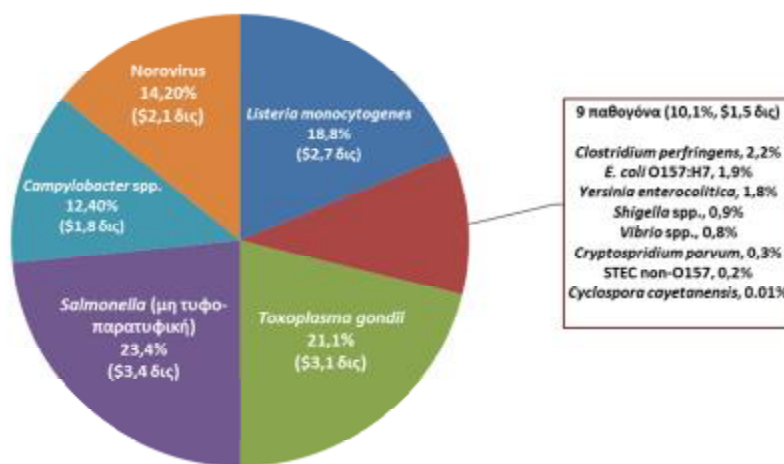


Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Τροφιμογενείς λοιμώξεις και παθογόνοι μικροοργανισμοί

Τροφιμογενείς λοιμώξεις

Τα τροφιμογενή νοσήματα αποτελούν σημαντικά αίτια νοσηρότητας και θνησιμότητας, καθώς επίσης κι ένα σημαντικό εμπόδιο για την κοινωνικο-οικονομική ανάπτυξη παγκοσμίως. Τα τροφιμογενή νοσήματα αναγνωρίζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) ως νοσήματα που έχουν προκληθεί από την κατανάλωση κάποιου τροφίμου ή νερού κι αποτελούν ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Στις ανεπτυγμένες χώρες, οι τροφιμογενείς λοιμώξεις έχουν αντίκτυπο περίπου στο 30 % του πληθυσμού (Vellusamy et al., 2010). Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Η.Π.Α.) υπολογίζεται ότι περίπου 9,4 εκατομμύρια περιστατικά που οφείλονται σε 31 τροφιμογενή παθογόνα συμβαίνουν κάθε χρόνο, εκ των οποίων 55.961 χρήζουν νοσοκομειακής περίθαλψης και 1.351 πεθαίνουν (Scallan et al., 2011). Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των Η.Π.Α. (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) θεωρεί ότι τα 14 παθογόνα που παρουσιάζονται στο σχήμα που ακολουθεί είναι υπεύθυνα για περισσότερο από το 95 % των περιστατικών τροφιμογενών νοσημάτων όπου έχει καταγραφεί το παθογόνο αίτιο.



Εικόνα 1. Τροφιμογενή παθογόνα υπεύθυνα για το 95 % των περιστατικών τροφιμογενών νοσημάτων και το οικονομικό κόστος σε δολάρια ανά έτος για το 2011 σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών των Η.Π.Α. (Hoffmann & Anekwe, 2013)

Σύμφωνα με την αναφορά του CDC (CDC, 2011), υπολογίζεται ότι οκτώ παθογόνα είναι υπεύθυνα για την πλειοψηφία των τροφιμογενών νοσημάτων που συμβαίνουν σε οικιακό

περιβάλλον, οδηγούν σε νοσοκομειακή περιθάληση και χαρακτηρίζονται από υψηλή θνησιμότητα στις Η.Π.Α. (Πίνακες 1, 2, 3).

Πίνακας 1. Τα πέντε πιο συνήθη παθογόνα που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα (CDC, 2011).

Παθογόνο	Ποσοστό (%)
Norovirus	58
<i>Salmonella</i> (μη τυφο-παρατυφική)	11
<i>Clostridium perfringens</i>	10
<i>Campylobacter</i> spp.	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	3
Υποσύνολο	91

Πίνακας 2. Τα πέντε πιο συνήθη παθογόνα που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα που χρήζουν νοσοκομειακής περίθαλψης (CDC, 2011).

Παθογόνο	Ποσοστό (%)
<i>Salmonella</i> (μη τυφο-παρατυφική)	35
Norovirus	26
<i>Campylobacter</i> spp.	15
<i>Toxoplasma gondii</i>	8
<i>E. coli</i> (STEC) O157	4
Υποσύνολο	88

Πίνακας 3. Τα πέντε πιο συνήθη παθογόνα που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα και σχετίζονται με υψηλή θνησιμότητα (CDC, 2011).

Παθογόνο	Ποσοστό (%)
<i>Salmonella</i> (μη τυφο-παρατυφική)	28
<i>Toxoplasma gondii</i>	24
<i>Listeria monocytogenes</i>	19
Norovirus	11
<i>Campylobacter</i> spp.	6
Υποσύνολο	88

Το 2012, δύο μεγάλες μελέτες διεξήχθησαν στις Η.Π.Α. σε σχέση με το οικονομικό κόστος που έχουν οι τροφιμογενείς νόσοι στις δομές της δημόσιας υγείας (Scarf, 2012, Hoffmann et al., 2012). Οι ερευνητές κι από τις δύο μελέτες συμφώνησαν ότι η νόσος που κοστίζει περισσότερο είναι η σαλμονέλωση (μη-τυφοειδής) και δεύτερη σε κόστος είναι η νόσος που προκαλείται από το πρωτόζωο *Toxoplasma gondii*, ενώ ακολουθούν η λιστερίωση (*L. monocytogenes*), οι ιώσεις που προκαλεί ο Norovirus κι η καμπυλοβακτηρίωση (*Campylobacter* spp.). Το κόστος από την εκδήλωση αυτών των πέντε παθογόνων φθάνει το 85 % του συνολικού κόστους που προέρχεται

από τα τροφιμογενή παθογόνα. Το ετήσιο κόστος που εκτιμήθηκε ανέρχεται σύμφωνα με τη μια μελέτη σε 14,6 δις δολάρια, ενώ σύμφωνα με την άλλη σε 16,3 δις δολάρια. Οι διαφορές πιστεύεται ότι οφείλονται σε διαφορετικές προσεγγίσεις των ερευνητικών ομάδων ως προς τις επιπτώσεις των τροφιμογενών ασθενειών και τη χρήση διαφορετικών κριτηρίων (π.χ. η εκτίμηση του κόστους των αποβολών σε εγκύους, θανάτων βρεφών, παραγωγικότητα των γονέων που περιθάλπουν ανήλικους ασθενείς) (Hoffmann & Anekwe, 2013).

Στην Ευρώπη, 5.196 τροφιμογενείς και υδατογενείς επιδημίες καταγράφηκαν σύμφωνα δεδομένα που συλλέχθηκαν από 32 Ευρωπαϊκές χώρες το 2013 (EFSA & ECDC, 2015). Η *Salmonella* αποτέλεσε τον πιο κοινό αιτιολογικό παράγοντα των ανωτέρω τροφιμογενών επιδημιών, ωστόσο παρουσίασε καθοδική τάση κατά 5,9 % σε σχέση με το 2012 (82.694 κρούσματα). Επίσης, σύμφωνα με την αναφορά, παρατηρήθηκε μειωμένη τάση ανίχνευσης της *Yersinia* κατά 2,9 % σε σχέση με το 2012 (6.471 κρούσματα). Αντιθέτως, ανοδική τάση κατά 8,6 % σε σχέση με το 2012 παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις της λιστερίωσης (1.763 κρούσματα) (EFSA & ECDC, 2015). Ο αριθμός των επιβεβαιωμένων κρουσμάτων σε ανθρώπους από βεροτοξινογόνα *E. coli* επίσης αυξήθηκε κατά 5,9 % σε σχέση με το 2012 (6.043 κρούσματα). Το 2013, καταγράφηκαν 386 επιδημίες (3.203 κρούσματα) που προκλήθηκαν από σταφυλοκοκκικές τοξίνες από 12 μέλη- κράτη της Ε.Ε., παρουσιάζοντας 12% αύξηση σε σχέση με το 2012.

Στην Ελλάδα σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ) ο αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων μη τυφο-παρατυφικής σαλμονέλλωσης το 2013 ήταν 417 περιστατικά, με συχνότερα απομονωμένους ορότυπους την *S. Enteritidis* και την *S. Typhimurium* (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2014a). Η δηλωθείσα επίπτωση της σαλμονέλλωσης μειώνεται σταθερά από το 2004 (1327 κρούσματα) κάτι που οφείλεται, εν μέρει, στα επιτυχημένα προγράμματα ελέγχου στον πρωτογενή τομέα εκτροφής πουλερικών. Η δηλούμενη επίπτωση της λιστερίωσης στην Ελλάδα είναι χαμηλή. Συγκεκριμένα, το διάστημα 2004-2013 δηλώθηκαν 73 κρούσματα λιστερίωσης στη χώρα μας (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2014b). Ποσοστό μεγαλύτερο του 50 % των δηλωθέντων κρουσμάτων αφορούσαν ανοσοκατεσταλμένα άτομα και η θνητότητα του νοσήματος μεταξύ των δηλωθέντων κρουσμάτων ήταν υψηλή (31,6 %). Ωστόσο, το 2015 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των δηλωθέντων κρουσμάτων της λιστερίωσης (35 κρούσματα), με αποτέλεσμα να είναι μείζονος σημασίας η επιτήρηση και η πρόληψη του νοσήματος στην Ελλάδα (Αγγελίδης, 2016). Η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση της λοίμωξης από εντεροαιμοραγικό κολιβακτηρίδιο (EHEC) για το χρονικό διάστημα 2004-2013 ήταν 0,07 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού (συνολικά δηλώθηκαν 8 κρούσματα), αποτελεί δηλαδή ένα σπάνια δηλούμενο νόσημα στη χώρα μας (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2014c). Ωστόσο, η αντίστοιχη μέση δηλούμενη επίπτωση στις χώρες της Ευρωπαϊκής

Ένωσης και στις χώρες της ΕΕΑ/ΕΦΤΑ (European Economic Area/European Free Trade Association) το 2011 ήταν 2,57 κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού εξαιτίας της επιδημίας στη Γερμανία (ECDC, 2013). Τα τρία προαναφερθέντα βακτήρια ανήκουν στο σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων (ΥΔΝ). Όσον αφορά το ποσοστό δήλωσης της υερσινίωσης 22 κρούσματα δηλώθηκαν το 2006 στην Ελλάδα, με κύριο είδος την *Yersinia enterocolitica* (EFSA, 2013). Η σταφυλοκοκκική τροφική τοξίνωση είναι μια από τις πλέον συχνές τροφικές διαταραχές σε πολλές χώρες, η καταγραφή όμως των κρουσμάτων δεν είναι συστηματική στην Ελλάδα, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν επιδημιολογικά στοιχεία. Ωστόσο, το ποσοστό αντίστασης των ανθεκτικών στην μεθικιλίνη απομονώσεων του *S. aureus* (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), κυμαινόταν από 25 έως 50 % στην Ελλάδα το 2014, σύμφωνα με την αναφορά του ECDC που αφορούσε νοσοκομειακές λοιμώξεις και αντιμικροβιακή αντοχή (ECDC, 2015).

Τροφιμογενή παθογόνα

Λαμβάνοντας υπόψιν τα ποσοστά δήλωσης και θνησιμότητας των ανωτέρω παθογόνων, επιλέχθηκαν να μελετηθούν στην παρούσα μελέτη οι εξής μικροοργανισμοί *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Y. enterocolitica* και *S. aureus*. Παρακάτω περιγράφονται ξεχωριστά το κάθε παθογόνο ως προς τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είδους, τις κλινικές εκδηλώσεις των νοσημάτων που προκαλεί, την επιδημιολογία του και το συσχετισμό του με τρόφιμα.

Salmonella enterica

Χαρακτηριστικά

Η *Salmonella* είναι Gram αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει δύο είδη: *S. enterica* που είναι το χαρακτηριστικό είδος και το *S. bongori* που παλαιότερα ήταν το υπο-είδος V. Το *S. enterica* περιλαμβάνει έξι υπο-είδη που χαρακτηρίζονται με λατινικό νούμερο και όνομα (I: *S. enterica* subsp. *enterica*, II: *S. enterica* subsp. *salamae*, IIIa: *S. enterica* subsp. *arizonae*, IIIb: *S. enterica* subsp. *diarizonae*, IV: *S. enterica* subsp. *houtenae*, VI: *S. enterica*, subsp. *indica*).

Η επιπλέον ταξινόμηση των στελεχών της σαλμονέλας γίνεται με βάση την παρουσία διαφορετικών αντιγόνων στο στρώμα των λιποπολυσακχαριτών του κυτταρικού

τοιχώματος (O), τα αντιγόνα του μαστίγιου (H) και τα αντιγόνα του ελύτρου (Vi). Τα τελευταία (Vi) συναντώνται μόνο στους ορότυπους Typhi, Paratyphi C και Dublin. Το είδος *S. enterica* υπολογίζεται ότι αριθμεί περίπου 2443 διαφορετικούς ορότυπους, ενώ το είδος *S. bongori* διαθέτει 20 ορότυπους. Άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό για την κατάταξή τους είναι η ευαισθησία τους σε συγκεκριμένους βακτηριοφάγους (PT: provisional phage type. DT: definitive phage type).

Κλινικές εκδηλώσεις

Οι ορότυποι *S. Typhi* και *S. Paratyphi* προκαλούν τον τυφοειδή πυρετό, μία πολύ σοβαρή γενικευμένη λοίμωξη που μεταδίδεται κυρίως από ανθρώπους-φορείς ή ασθενείς. Τα ποσοστά θνησιμότητας ανέρχονται περίπου στο 10 %. Θεωρείται ότι τα κρούσματα της ασθένειας αυτής είναι εξαιρετικά σπάνια στις αναπτυγμένες χώρες κατά τον 21^ο αιώνα, εξαιτίας των μέτρων υγιεινής που λαμβάνονται, της χλωρίωσης του νερού και της θεραπείας με αντιβιοτικά.

Η μη-τυφοειδής σαλμονέλωση είναι μία εντοπισμένη σοβαρή λοίμωξη του εντερικού επιθηλίου. Τα συμπτώματα είναι διάρροια με αφυδάτωση, εμετό, κοιλιακό πόνο και πυρετό. Ο χρόνος επώασης για την εκδήλωση των συμπτωμάτων είναι 12-72 h και η διάρκεια των συμπτωμάτων είναι 2-7 ημέρες.

Η μόλυνση γίνεται μέσω της επαφής με κάποιο ασθενή ή φορέα του βακτηρίου, αλλά πιο συχνά μέσω της κατανάλωσης κάποιου μολυσμένου τροφίμου. Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων εξαρτάται από την μολυσματικότητα του στελέχους που προσβάλλει τον άνθρωπο, αλλά και από τη γενικότερη κατάσταση της υγείας του προσβεβλημένου. Οι ιδιαίτερα επιθετικοί ορότυποι (*Choleraesuis*, *Dublin*) μπορεί να προκαλέσουν και γενική σηψαιμία και το ποσοστό θνησιμότητας ανέρχεται στο 1 %.

Τα άτομα που ανήκουν σε ευαίσθητες ομάδες, όπως νεογνά, παιδιά, ηλικιωμένοι και ανοσοκατεσταλμένοι πιθανόν να εκδηλώσουν πολύ βαρύτερα συμπτώματα. Η δόση του παθογόνου που είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της ασθένειας (μολυσματική δόση) ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος, τον ασθενή, αλλά και το τρόφιμο-φορέα. Υπολογίζεται ότι για κάποιον υγιή ενήλικα απαιτείται η κατανάλωση περισσότερων από 10.000 κυττάρων. Υπάρχουν όμως πολλές αναφορές που δείχνουν ότι και με πολύ λιγότερα κύτταρα μπορεί να προκληθεί ασθένεια (<100 κύτταρα του παθογόνου). Κοινό στοιχείο σε αυτές τις περιπτώσεις ήταν η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη των τροφών που μετέφεραν το παθογόνο (π.χ. σοκολάτα, τυριά), που αυξάνουν την πιθανότητα επιβίωσης του παθογόνου στο χαμηλό pH του στομάχου (Montville & Matthews, 2010). Εκτός

από την σοβαρή γαστρεντερίτιδα, οι άνθρωποι που προσβάλλονται από σαλμονέλα μπορεί να εμφανίσουν στη συνέχεια και άλλες επιπλοκές όπως μηνιγγίτιδα, οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, πνευμονία, χολοκυστίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα κ.ά.

Επιδημιολογία

Πιστεύεται ότι κάθε χρόνο 90 εκατομμύρια άνθρωποι προσβάλλονται από σαλμονέλωση, ενώ το κόστος για τα συστήματα Δημόσιας Υγείας ανέρχεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε 3 δις € και στις Η.Π.Α. σε 2,7 δις δολάρια (Matther et al., 2013). Στις Η.Π.Α. αναφέρεται από το CDC ότι προσβάλλονται περίπου 1,2 εκατομμύρια άνθρωποι ετησίως. Από αυτούς, οι 23.000 νοσηλεύονται σε νοσοκομεία, ενώ περίπου 450 πεθαίνουν. Οι Majowicz et al. (2010) υπολογίζουν ότι, σε παγκόσμιο επίπεδο, προσβάλλονται περίπου 93,8 εκατομμύρια άνθρωποι από σαλμονέλωση ετησίως και ότι 155.000 πεθαίνουν.

Συσχετισμός με τρόφιμα

Παραδοσιακά τα τρόφιμα που έχουν ενοχοποιηθεί περισσότερο είναι το κρέας των πουλερικών, τα αβγά και όλα τα τρόφιμα που περιέχουν τα συστατικά αυτά. Όμως όλα τα κρέατα και γενικότερα τα προϊόντα ζωικής προέλευσης (γάλα, τυρί) έχουν ενοχοποιηθεί κατά καιρούς ως φορείς σαλμονέλας. Τα τελευταία χρόνια όλο και πιο συχνά παρατηρούνται επιδημίες κρουσμάτων σαλμονελώσεων από την κατανάλωση φρέσκων λαχανικών και φρούτων ή προϊόντων που δεν θεωρούνταν μέχρι πρόσφατα ως υπεύθυνα τρόφιμα (π.χ. ντομάτες) (CDC, 2002, Cummings et al., 2001, Hedburg et al., 1999).

Escherichia coli

Χαρακτηριστικά

Η *E. coli* αποτελεί μέλος της εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου και των ζώων, σε ποσοστό λιγότερο από 1 % του συνόλου των μικροοργανισμών και αριθμεί περίπου 10^8 κύτταρα ανά γραμμάριο εντερικού περιεχομένου των ενηλίκων. Μεταδίδεται από τη μητέρα στο νεογνό κατά τον τοκετό και είναι από τα πρώτα είδη που αποικίζουν το έντερο. Είναι Gram αρνητικός βάκιλος, ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και δεν σχηματίζει ενδοσπόρια, ενώ συνήθως

έχει αυτόνομη κίνηση (περίτριχα μαστίγια).

Για την πλήρη ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώνονται είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός του ορότυπου. Έχουν αναγνωριστεί περίπου 170 διαφορετικά σωματικά αντιγόνα στο κυτταρικό τοίχωμα (O), περίπου 50 βλεφαριδικά αντιγόνα (H) και πάνω από 70 αντιγόνα κάψας (K). Τα περισσότερα στελέχη του *E. coli* δεν είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, αλλά κάποια έχουν συνδεθεί με παθογένεια και ιδιαίτερα με εκδήλωση διάρροιας.

Οι κατηγορίες παθογόνων στελεχών *E. coli* είναι οι εξής:

Εντερο-παθογόνα (Enteropathogenic-EPEC)

Εντερο-τοξινογόνα (Enterotoxigenic-ETEC)

Εντερο-διεισδυτικά (Enteroinvasive-EIEC)

Shiga-τοξινογόνα, Βέρο-τοξινογόνα (Shiga toxin/verotoxin- STEC/VTEC)

Εντερο-συσσωρευτικά (Enteroadgregative-EAEC)

Τα στελέχη που ανήκουν στην υποκατηγορία των βεροτοξινογόνων (VTEC) παράγουν κυτταροτοξικούς παράγοντες για τα νεφρικά κύτταρα (vero) του πράσινου αφρικανικού πιθήκου και ονομάζονται βεροτοξίνες (vero) ή σιγκατοξίνες λόγω της ομοιότητάς τους με την τοξίνη που παράγει το *Shigella dysenteriae* (shiga). Σε αυτή την υποκατηγορία ανήκουν επίσης και τα εντερο-αιμορραγικά στελέχη (Enterohemorrhagic- EHEC), τα οποία προκαλούν περιστατικά αιμορραγικής διάρροιας μετά από την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου ή πόσιμου νερού. Οι πιο γνωστοί ορότυποι αυτών των στελεχών είναι ο O26, O111 και ο O157, αλλά υπάρχουν και άλλοι. Ο τρόπος δράσης σε κυτταρικό επίπεδο του πιο χαρακτηριστικού και γνωστού οροτύπου της ομάδας αυτής, του O157:H7, είναι ο ακόλουθος: προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο προκαλώντας αλλοιώσεις που καταστρέφουν τις μικρολάχνες τοπικά και στη συνέχεια εισέρχεται στα κύτταρα όπου παράγει τοξίνες, οι οποίες διαφεύγουν από τον εντερικό αυλό και προκαλούν γενικευμένες βλάβες. Πιστεύεται ότι οι τοξίνες αυτές καταστρέφουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ιδιαίτερα αυτά των νεφρών.

Κλινικές εκδηλώσεις

Ο χρόνος επώασης της ασθένειας είναι 3-9 ημέρες και η διάρκεια των συμπτωμάτων μπορεί να είναι 2-9 ημέρες. Τα συμπτώματα ξεκινούν με υδαρή διάρροια που γρήγορα καταλήγει σε αιμορραγική κολίτιδα (έντονος κοιλιακός πόνος, αιμορραγική διάρροια, εμετός, απουσία

πυρετού). Σε ένα ποσοστό περίπου 5-10 % των ασθενών εκδηλώνεται θρόμβωση σε μικροαγγεία που μπορεί να καταλήξει σε αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο. Το σύνδρομο αυτό οδηγεί σε οξεία θρομβοκυτταροπενία και ειδικά στα παιδιά σε οξεία νεφρική ανεπάρκεια, αλλά εκτός από τους νεφρούς μπορεί να επηρεαστούν και άλλα όργανα. Η θνησιμότητα μπορεί να φθάσει περίπου στο 3 %. Η μολυσματική δόση αναφέρεται σε λιγότερο από 100 κύτταρα του παθογόνου (Montiville & Matthews, 2010). Σε επιδημία κρουσμάτων στις Η.Π.Α. από κατανάλωση μολυσμένων προτηγανισμένων κεφτέδων το 1993, υπολογίστηκε ότι σε ένα γραμμάριο τροφίμου περιέχονταν 0,3 – 15 CFU του παθογόνου.

Επιδημιολογία

Υπολογίζεται ότι η *E. coli* O157:H7 προκαλεί κάθε χρόνο στις Η.Π.Α. περίπου 73.500 περιστατικά. Κατά την περίοδο 1982-2002 αναφέρθηκαν στο CDC 350 επιδημίες σε 49 πολιτείες, που είχαν ως αποτέλεσμα να ασθενήσουν 8.598 άνθρωποι, εκ των οποίων οι 1493 χρειάστηκε να νοσηλευτούν. Από αυτά τα περιστατικά, 354 παιδιά έπαθαν αιμολυτικό – ουραιμικό σύνδρομο και 40 απεβίωσαν (Rangel et al., 2005). Η κύρια πηγή λοίμωξης του ανθρώπου είναι μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων.

Συσχετισμός με τρόφιμα

Τα πιο επικίνδυνα τρόφιμα για την μετάδοση του παθογόνου, διαφέρουν μεταξύ των χωρών και αντανακλούν τις διατροφολογικές συνήθειες των κατοίκων. Για παράδειγμα, η μεγαλύτερη επιδημία εντεροαιμορραγικής κολίτιδας που οφείλονταν στην *E. coli* O157:H7 συνέβη στην Ιαπωνία (Sakai) το 1996, με 7.966 περιστατικά, 2.764 εκ των οποίων η ανίχνευση του παθογόνου επιβεβαιώθηκε εργαστηριακά και 106 από αυτά εξελίχθηκαν σε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Το υπέθυνο τρόφιμο ήταν φύτρα από άσπρο ραπανάκι. Στις Η.Π.Α. και σε άλλες δυτικές χώρες, η συνηθέστερη πηγή μόλυνσης του ανθρώπου είναι το κρέας και ειδικότερα το μοσχαρίσιο. Επίσης, ανιχνεύεται συχνά σε γαλακτοκομικά προϊόντα, αλλά και σε άλλα τρόφιμα όπως φρούτα και λαχανικά και χυμός μήλου (Pennington, 2010).

Yersinia spp.

Χαρακτηριστικά

Στο γένος *Yersinia* συγκαταλέγονται 19 είδη εκ των οποίων μόνο η *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* και μερικά στελέχη *Y. enterocolitica* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο (le Guern et al., 2016). Η *Y. enterocolitica* είναι Gram αρνητικό, μη σπορογόνο βακτήριο της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Garrity et al., 2005, Murray et al., 2007). Είναι προαιρετικά αναερόβιο και παρουσιάζει κινητικότητα με χρήση περίτριχων μαστιγίων κάτω από τους 30 °C, αλλά όχι στους 37 °C (Murray et al., 2007). Μπορεί να αναπτυχθεί σ' ένα ευρύ θερμοκρασιακό φάσμα από -1 °C έως 40 °C με βέλτιστη τιμή τους 29 °C. Είναι θετικός στη καταλάση και αρνητικός στην οξειδάση. Υπάρχουν 6 βιότυποι (1A, 1B, 2, 3, 4 και 5) που περιλαμβάνουν 50 διαφορετικούς ορότυπους, ωστόσο μόνο συγκεκριμένοι ορότυποι είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο (Huoninen et al., 2010, Krauss et al., 2003). Οι οροομάδες είναι ομάδες ορότυπων που έχουν κοινά αντιγόνα επιφανείας και κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με το ποιο αντιγόνο O εκφράζουν (Garrity et al., 2005). Ορισμένες οροομάδες είναι συγκεκριμένες για διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, π.χ. οι οροομάδες O:3 και O:9 είναι υπεύθυνες για επιδημίες στην Ευρώπη, ενώ η O:8 ανιχνεύεται στις Η.Π.Α., οι O:5 και O:27 στον Καναδά και την Ιαπωνία (Krauss et al., 2003).

Κλινικές εκδηλώσεις

Η λοίμωξη με *Y. enterocolitica* χαρακτηρίζεται από εντερίτιδα, εντεροκολίτιδα (κυρίως στα παιδιά), πυρετό, υδαρείς κενώσεις, κοιλιακό άλγος και οξεία μεσεντερική λεμφαδενίτιδα (συμπτώματα που μπορεί να συγχέονται με τη σκωληκοειδίτιδα) και σε ορισμένες περιπτώσεις οξεία ειλεΐτιδα (Bottone et al., 1999, Krauss et al., 2003, Ryan & Ray, 2004). Αρθρίτιδα και οζώδες ερύθημα μπορεί να εμφανιστούν σε 1-3 εβδομάδες μετά τα αρχικά κλινικά συμπτώματα και να διαρκέσουν περίπου 6 μήνες μετά τη λοίμωξη (Krauss et al., 2003). Σε σπάνιες περιπτώσεις, οι επιπλοκές μπορεί να περιλαμβάνουν μηνιγγίτιδα, ενδοφθαλμίτιδα, επιπεφυκίτιδα, μυοκαρδίτιδα, πνευμονία, πνευμονικό απόστημα, ηπατίτιδα, χολαγγειίτιδα, περιτονίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα, ουρηθρίτιδα, αιμολυτική αναιμία, θυρεοειδίτιδα, φαρυγγίτιδα και σηψαιμία (Bottone et al., 1999, Krauss et al., 2003, Murray et al., 2007). Το ποσοστό θνησιμότητας ατόμων σε ανοσοκαταστολή λόγω σηψαιμίας μπορεί να ανέλθει έως και 50 % (Krauss et al., 2003).

Επιδημιολογία

Η νόσος έχει εξαπλωθεί σε παγκόσμιο επίπεδο, αν και είναι λιγότερο κοινή σε τροπικές περιοχές (Krauss et al., 2003, Murray et al., 2007). Λοιμώξεις από *Y. enterocolitica* μπορεί να εδηλωθούν σε όλη τη διάρκεια του έτους, αλλά τα περισσότερα κρούσματα παρατηρούνται το φθινόπωρο και το χειμώνα (Krauss et al., 2003). Οι χοίροι συνιστούν σημαντική δεξαμενή της *Y. enterocolitica*. Επίσης, το παθογόνο έχει απομονωθεί από ανθρώπους, θερμόαιμα ζώα (κυρίως στα εκτρεφόμενα ζώα και τα κατοικίδια ζώα), πουλιά και σπάνια από ερπετά, ψάρια και οστρακοειδή (Krauss et al., 2003, Murray et al., 2007). Έχει απομονωθεί από εντερικό περιεχόμενο ασυμπτωματικών χοίρων, σκύλων και γατών. Η μολυσματική δόση *per os* είναι περίπου 10^8 βακτήρια (Fleming & Hunt, 2006). Η περίοδος επώασης για αυτό το βακτήριο είναι 3-10 ημέρες (Krauss et al., 2003). Μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο έχει αναφερθεί σπάνια σε σχολεία, νοσοκομεία και κέντρα ημερήσιας φροντίδας (Murray et al., 2007). Επίσης, έχουν αναφερθεί νοσοκομειακές λοιμώξεις καθώς και λοιμώξεις λόγω μετάγγισης αίματος (Murray et al., 2007, Vonberg & Gastmeier, 2007). Η μετάδοση της νόσου στον άνθρωπο γίνεται μέσω κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων ή σπανιότερα από άνθρωπο σε άνθρωπο μέσω της εντερο-στοματικής οδού (ωμό ή ατελώς μαγειρεμένο χοίρειο κρέας και τα προϊόντα του, τοφού, μη παστεριωμένο γάλα και μη επεξεργασμένο νερό έχουν ενοχοποιηθεί στο παρελθόν) (Krauss et al., 2003, Ryan & Ray, 2004).

Συσχετισμός με τρόφιμα

Στην Ευρώπη, οι χοίροι είναι συχνά ασυμπτωματικοί φορείς ανθρώπινων παθογόνων στελεχών *Y. enterocolitica*, σε συγκεκριμένα στελέχη του βιότυπου 4 (ορότυπος O:3), και λιγότερο συχνά του βιότυπου 2 (ορότυπος O:9). Οι μικροοργανισμοί ανευρίσκονται στη στοματική κοιλότητα, ιδιαίτερα στις αμυγδαλές, στα υπογνάθια λεμφογάγγλια, στο έντερο και στα κόπρανα. Οι τεχνικές σφαγής και οι συνθήκες υγιεινής κατά τη σφαγή μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά το ποσοστό μόλυνσης του κρέατος. Η μόλυνση του κρέατος μέσω κοπράνων μπορεί να μειωθεί σημαντικά εσωκλείοντας το ορθό με μια πλαστική σακούλα αμέσως μόλις αφαιρεθεί από το σφάγιο (Andersen, 1988). Δεδομένου ότι η στοματική κοιλότητα είναι συχνά μολυσμένη, ο χειρισμός της κεφαλής κατά τη σφαγή (αφαίρεση της γλώσσας και η μετά τη σφαγή επιθεώρηση) μπορεί να οδηγήσει στην εξάπλωση της μόλυνσης που υπάρχει σε αυτό το μέρος του σφαγίου. Οι μύες που βρίσκονται κοντά στις αμυγδαλές όπως ο διγαστρος μπορεί συχνά να επιμολυνθούν (De Zutter & Van Hoof, 1987). Κατά συνέπεια, βρώσιμα όργανα όπως γλώσσες, καρδιές και ήπαρ είναι τα

συχνότερα και σε μεγαλύτερο βαθμό μολυσμένα τεμάχια από τα σφάγια χοίρων. Επίσης φαινόμενα διασταυρούμενης επιμόλυνσης από χοιρινό σε βόειο κρέας έχουν παρατηρηθεί σε κρεοπωλεία πιθανόν λόγω της κοινής χρήσης κιμαδομηχανής (Andersen et al., 1991).

Παθογόνα στελέχη έχουν απομονωθεί από γάλα και τα προϊόντα του. Συγκεκριμένα, επιμολυσμένο παστεριωμένο γάλα, σοκολατούχο γάλα και γάλα μετά από ανασύσταση σκόνης γάλακτος έχει συσχετιστεί με επιδημίες από το βιότυπο 1B (Ackers et al., 2000, Black et al., 1978, Morse et al., 1984, Shayegani et al., 1983, Tacket et al., 1984). Η κατανάλωση μη επεξεργασμένου νερού αποτέλεσε παράγοντα κινδύνου στις Η.Π.Α., καθώς επιδημίες έχουν συσχετιστεί με το βιότυπο 1B λόγω κατανάλωσης νερού από πηγάδια ή ποτάμια ή χρήσης τέτοιου νερού για παρασκευή τροφίμων (Keet, 1974, Tacket et al., 1985, Thompson & Gravel, 1986). Στην Ευρώπη μόνο λίγα περιστατικά λοίμωξης από *Y. enterocolitica* σχετίζονται με κατανάλωση νερού (Christensen, 1979). Λοιμώξεις *Y. enterocolitica* βιότυπος 4 (ορότυπος O:3) έχουν διαπιστωθεί σε σκύλους και γάτες, και αυτά ζώα μπορεί περιστασιακά να είναι ασυμπτωματικοί φορείς παθογόνων στελεχών *Yersinia* (Fredriksson-Ahomaa et al., 2001).

Listeria monocytogenes

Χαρακτηριστικά

Το γένος *Listeria* ανήκει στα Gram θετικά βακτήρια και έχει 17 είδη, εκ των οποίων παθογόνο του ανθρώπου είναι ουσιαστικά μόνο το είδος *L. monocytogenes*. Τα στελέχη της *L. monocytogenes* ομαδοποιούνται σε περαιτέρω κατηγορίες με βάση τον αντιγονικό τους τύπο (1,2,4: σωματικά αντιγόνα, a, b, c: αντιγόνα μαστίγιου) ή το γενετικό τους προφίλ. Υπάρχουν 13 διαφορετικοί ορότυποι, ενώ τρεις από αυτούς (1/2a, 1/2b, 4b) απομονώνονται από τα περισσότερα περιστατικά ανθρώπινων λιστεριώσεων. Μία άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ομαδοποίηση των στελεχών είναι το προφίλ του γενετικού τους υλικού με ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE), μέθοδος που χρησιμοποιείται από τα εργαστήρια που ασχολούνται με την επιδημιολογία της νόσου (PulseNet).

Ο μικροοργανισμός είναι μικροαερόφιλος, μη σπορογόνος βάκιλος με διαστάσεις 0,4-0,5 μm πλάτος και 0,5-2 μm μήκος. Παρουσιάζει έντονη κινητικότητα με τη βοήθεια περίτριχων μαστιγίων και χαρακτηριστικό της είναι η περιστροφική κίνηση. Ο βαθμός της κινητικότητάς της εξαρτάται από τη θερμοκρασία και είναι μέγιστος όταν η θερμοκρασία κυμαίνεται

μεταξύ 20-25 °C. Από 37 °C και πάνω η παραγωγή μαστιγίων μειώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα τη μείωση της κινητικότητας (Farber & Peterkin, 1991, Lovett, 1982).

Το παθογόνο έχει ευρεία εξάπλωση στη φύση, σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα και φαίνεται ότι υπάρχει σε αρκετές πρώτες ύλες φυτικής προέλευσης, αλλά και στα περιττώματα ζώων. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 0-45 °C γεγονός που την καθιστά επικίνδυνη και για μολυσμένα τρόφιμα υπό ψύξη (Montville & Matthews, 2010).

Κλινικές εκδηλώσεις

Η *L. monocytogenes* προσβάλλει κυρίως άτομα που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή για διάφορους λόγους π.χ. λόγω μεταμόσχευσης, συγκεκριμένης φαρμακευτικής αγωγής (χημειοθεραπευτικά, κορτιζόνη κ.λ.π.), HIV λοίμωξης, εγκυμονούσες γυναίκες, καρκινοπαθείς, ηλικιωμένοι, παιδιά. Το παθογόνο μεταδίδεται μέσω τριών οδών: επαφή με ζώα, μόλυνση νεογνών στο νοσοκομείο και μέσω μολυσμένων τροφίμων (Montville & Matthews, 2010).

Η τροφιμογενής μόλυνση ανοσολογικά υγιών ενηλίκων μπορεί να προκαλέσει ασυμπτωματική ή μέτριας βαρύτητας νόσο, ή μπορεί να προσβάλλει το κεντρικό νευρικό σύστημα (μηνιγγίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, σηψαιμία). Ο χρόνος επώασης κυμαίνεται από 1 ημέρα έως 5 εβδομάδες. Η τροφιμογενής μόλυνση εγκυμονούσας γυναίκας, εκδηλώνεται στη μητέρα είτε ως ήπια γρίπη είτε είναι ασυμπτωματική. Εμφανίζονται όμως σοβαρές επιπλοκές στο έμβρυο (αποβολή, θνησιγενές έμβρυο) ή στο νεογνό (νεογνική μηνιγγίτιδα).

Το παθογόνο έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή και με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η έκθεσή του στα αντισώματα και στις αντιμικροβιακές ουσίες που μπορεί να υπάρχουν στο αίμα. Σημαντικό όπλο του παθογόνου είναι η αιμολυσίνη (λιστεριολυσίνη O). Ο ρόλος της είναι διττός, επιτρέπει στα βακτήρια να ξεφύγουν από το φαγόσωμα και να εισχωρήσουν στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Τα βακτήρια προσβάλλουν τα εντερικά κύτταρα ή κύτταρα M (πλάκες Peyer) και μεταφέρονται από τα μακροφάγα μέσω του αίματος στους λεμφικούς αδένες, στο ήπαρ και το σπλήνα που αποτελούν τα όργανα-στόχους. Εάν δεν καταστραφούν από τα μακροφάγα, έστω κι ελάχιστα κύτταρα μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και να οδηγήσουν σε γενικευμένη λοίμωξη των δευτερογενών οργάνων-στόχων (ΚΝΣ, πλακούντας). Η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί τα μόρια ακτίνης του ξενιστή για να κινείται ενδοκυτταρικά (Montville & Matthews, 2010).

Επιδημιολογία

Στην Ευρώπη, 1763 κρούσματα λιστερίωσης καταγράφηκαν το 2013 (EFSA & ECDC, 2015). Το ποσοστό θνησιμότητας ήταν αρκετά υψηλό (15,6 %) και καταγράφηκαν συνολικά 191 θάνατοι. Η μολυσματική δόση του παθογόνου είναι δύσκολο να υπολογιστεί γιατί εξαρτάται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, το τρόφιμο, το στέλεχος κ.ά. Σε επιδημίες κρουσμάτων λιστερίωσης οι πληθυσμοί του παθογόνου ήταν μεγαλύτεροι συνήθως από 100 κύτταρα ανά γραμμάριο τροφίμου. Υπήρχαν επίσης όμως περιπτώσεις (λουκάνικα Φρανκφούρτης το 1998) που η αντίστοιχη δόση ήταν μικρότερη από 0,3 κύτταρα ανά γραμμάριο τροφίμου (Montville & Matthews, 2010).

Συσχετισμός με τρόφιμα

Λόγω του γεγονότος ότι το βακτήριο μπορεί να επιβιώνει σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι απομονώνεται από το χώμα, το νερό και από χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Αυτή η ευρεία κατανομή του μικροοργανισμού στο φυσικό περιβάλλον σε συνδυασμό με την ασυνήθιστη ικανότητά του να προσαρμόζεται και να επιβιώνει κάτω από ακραίες συνθήκες σε σύγκριση με άλλα παθογόνα, καθιστούν τη *L. monocytogenes* μια σημαντική πρόκληση όσον αφορά την εξάλειψη και τον έλεγχο του σε χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Αν και οι μέθοδοι διασφάλισης ποιότητας έχουν αναπτυχθεί κι εφαρμοστεί για τον έλεγχο της μόλυνσης από *L. monocytogenes* σε όλα τα στάδια επεξεργασίας των τροφίμων, πολλές μελέτες δείχνουν ότι η πιο σημαντική πηγή μόλυνσης των τροφίμων είναι η διασταυρούμενη επιμόλυνση από τον εξοπλισμό και από το γενικότερο περιβάλλον μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας των τροφίμων. Υποστηρίζεται ότι συχνά συγκεκριμένα στελέχη του είδους απομονώνονται από το περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων (π.χ. αποχετεύσεις, εξοπλισμός κ.ά.) κι ιδιαίτερα από περιοχές που είναι κοντά σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα (π.χ. μηχανήματα κοπής).

Ο μικροοργανισμός έχει απομονωθεί ουσιαστικά από όλα τα είδη τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων φυτικής και ζωικής προέλευσης. Παραδοσιακά, επικίνδυνα για την πρόκληση λιστερίωσης θεωρούνταν τρόφιμα όπως τα μαλακά τυριά, τα πατέ και τα αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας. Οι σχετικές, ωστόσο διερευνητικές μελέτες, δείχνουν την παρουσία του

παθογόνου σε ποικίλλα ποσοστά σχεδόν σε όλα τα είδη των ωμών κρεάτων, θαλασσινών, ψαριών και μη-παστεριωμένο γάλα. Η μη-αποτελεσματική παστερίωση του γάλατος αλλά και η μεταπαστεριωτική επιμόλυνση μπορεί να αποτελέσουν αιτίες παρουσίας του παθογόνου σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι μολυσμένες έτοιμες για κατανάλωση τροφές είναι πολύ επικίνδυνες για την μετάδοση της νόσου, ειδικά εάν δεν επεξεργαστούν περαιτέρω θερμικά. Επίσης, η παρουσία του παθογόνου είναι συχνή σε σαλάτες και λαχανικά (Montville & Matthews, 2010).

Staphylococcus aureus

Χαρακτηριστικά παθογόνου

Ο *S. aureus* είναι Gram-θετικό, μη σπορογόνο βακτήριο σε σχήμα κόκκου, το οποίο ανήκει στο γένος *Staphylococcus* spp, που υποδιαιρείται σε 32 είδη και υποείδη. Ο *S. aureus* παράγει σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (staphylococcal enterotoxins) που είναι υπεύθυνες για τροφιμογενείς τοξινώσεις (FDA, 2012, Montville & Matthews, 2008). Ο *S. intermedius*, μπορεί επίσης να παράγει εντεροτοξίνη, αλλά σπάνια έχει συνδεθεί με τροφοτοξινώσεις (Khambaty et al., 1994, Le Loir et al., 2003, Talan et al., 1989).

Η ανάπτυξη και η επιβίωση του *S. aureus* εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η ενεργότητα νερού (a_w), το pH, η παρουσία οξυγόνου και η σύσταση του τροφίμου. Τα όρια ανάπτυξης του *S. aureus* αναφορικά με τους παραπάνω παράγοντες διαφέρουν ανάλογα με το στέλεχος *S. aureus* (Stewart 2003). Η θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται από 7–48 °C, με βέλτιστη τους 37 °C. Ο *S. aureus* θανατώνεται με τη παστερίωση ή το μαγείρεμα των τροφών. Η ανάπτυξη του *S. aureus* είναι δυνατή σε εύρος pH 4–10, με βέλτιστο 6–7 (ICMSF, 1996, Stewart, 2003). Τα περισσότερα στελέχη *S. aureus* μπορούν να αναπτυχθούν σε εύρος a_w από 0,83 έως >0,99 (FDA, 2012). Ο *S. aureus* είναι προαιρετικά αναερόβιος. Ωστόσο, ο ρυθμός ανάπτυξής του περιορίζεται σε αναερόβιες συνθήκες (Stewart, 2003). Για μη-σπορογόνο μεσόφιλο βακτήριο, ο *S. aureus* θεωρείται σχετικά θερμοανθεκτικός (Stewart,2003).

Κλινικές εκδηλώσεις

Τα συμπτώματα της σταφυλοκοκκικής λοίμωξης εμφανίζονται σύντομα μετά τη κατανάλωση του ύποπτου τροφίμου με χρόνο επώσης περίπου 3 ώρες (1-6 ώρες). Τα συνήθη συμπτώματα είναι ναυτία, εμετός, διάρροια και γαστρικό άλγος. Σε σοβαρές περιπτώσεις

παρατηρούνται πονοκέφαλος, μυϊκές συσπάσεις, παροδικές μεταβολές στη πίεση του αίματος και στον καρδιακό ρυθμό. Η ανάρρωση γίνεται συνήθως σε 1–3 μέρες (Stewart 2003; FDA 2012). Η θνητότητα είναι σπάνια (0.03% για το γενικό πληθυσμό), αλλά περιστασιακά αναφέρεται υψηλότερο ποσοστό σε παιδιά (4.4% θνητότητα) (Montville & Matthews, 2008).

Η σταφυλοκοκκική τοξίνωση προκαλείται από την κατανάλωση τροφής που περιέχει προσχηματισμένη εντεροτοξίνη (Argudin et al., 2010). Υπάρχουν διάφοροι τύποι εντεροτοξίνης, η εντεροτοξίνη A είναι η πιο κοινή που σχετίζεται με τροφοτοξινώσεις. Επίσης, οι εντεροτοξίνες D, E, H, και σε μικρότερη συχνότητα οι B, G, I, έχουν συσχετιστεί με τη τροφοτοξίνωση (Pinchuk et al., 2010, Seo & Bohach, 2007). Οι εντεροτοξίνες παράγονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης με την παραγόμενη ποσότητα να εξαρτάται από το στέλεχος.

Τυπικά δόσεις εντεροτοξίνης που μπορούν να προκαλέσουν τοξίνωση αντιστοιχούν σε πληθυσμούς $10^5 - 10^8$ CFU/g του *S. aureus* (Montville & Matthews, 2008, Seo & Bohach, 2007). Ο *S. aureus* παράγει εντεροτοξίνη σε εύρος θερμοκρασίας 10–48 °C, με βέλτιστο τους 40–45 °C. Καθώς η θερμοκρασία μειώνεται, αντίστοιχα μειώνεται και το επίπεδο παραγωγής της εντεροτοξίνης. Όμως η εντεροτοξίνη παραμένει σταθερή σε συνθήκες κατάψυξης και είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στη θέρμανση καθώς δεν αδρανοποιείται κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης κονσερβοποιημένων τροφίμων χαμηλής οξύτητας. Η παραγωγή της εντεροτοξίνης παρατηρείται σε εύρος pH 4,5–9,6, με βέλτιστο το 7–8. Η παραγωγή εντεροτοξίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες, αν και ιδανικές θεωρούνται οι αερόβιες (ICMSF, 1996, Stewart, 2003).

Σε πειραματική δοκιμή σε ανθρώπους δόση 20–25 μg εντεροτοξίνης B βρέθηκε ικανή να προκαλέσει σταφυλοκοκκική λοίμωξη (Raj & Bergdoll 1969). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι και δόση της τάξης 1.0 μg εντεροτοξίνης προκαλεί τροφολοίμωξη (FDA 2012). Στην πραγματικότητα κατανάλωση 200 ng εντεροτοξίνης A είναι ικανή να προκαλέσει νόσο σε ευαίσθητους πληθυσμούς (Asao et al., 2003, Evenson et al., 1988).

Επιδημιολογία

Η σταφυλοκοκκική τοξίνωση οφείλεται στη κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν εντεροτοξίνη που παρήχθει από *S. aureus*. Οι χειριστές τροφίμων που είναι φορείς εντεροτοξινογόνου *S. aureus* (στη μύτη ή στα χέρια τους) αποτελούν τη κύρια πηγή επιμόλυνσης τροφίμων μέσω της άμεσης επαφής ή μέσω των εκκρίσεων τους (Argudin et al., 2010). Στην

Ε.Ε. κατγράφηκαν κατά μέσο όρο 0,13 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού το 2013 (EFSA & ECDC, 2015). Στις Η.Π.Α. ο *S. aureus* προκάλεσε 0,04 περιστατικά τροφολοξίνωσης ανά 100.000 πληθυσμού το 2010 και 0,03 το 2009 (CDC, 2012). Υπολογίζεται μάλιστα ότι η τροφολοξίνωση από *S. aureus* αντιστοιχεί στο ποσοστό 2,6 % των συνολικών τροφολοιμώξεων στις Η.Π.Α. (Scallan et al., 2011). Μια επιδημία από ανθεκτικό στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκο (MRSA) που παρήγαγε εντεροτοξίνη καταγράφηκε το 2002 λόγω κατανάλωσης χοιρινού σε εστιατόριο (Jones et al., 2002). Το ίδιο στέλεχος με την τεχνική της PFGE ανιχνεύθηκε στη ρινική κοιλότητα ενός εκ των χειριστών τροφίμων του εστιατορίου. Αν και αποικίζει μεγάλο εύρος ζώων ο άνθρωπος αποτελεί τη σημαντικότερη δεξαμενή του *S. aureus* (Montville & Matthews, 2008). Ο επιπολασμός του εντεροτοξιγόνου *S. aureus* σε χειριστές τροφίμων ποικίλει ανάλογα με τη χώρα και τη βιομηχανία. Ο επιπολασμός ποικίλει από 2 % σε χειριστές τροφίμων στην Ιταλία (n = 545) (Talarico et al., 1997), στο 12 % σε φροντιστές πτήσεων στη Φινλανδία (n = 136) (Hatakka et al., 2000), 19 % σε εργαζόμενους εστιατορίων στη Χιλή (n = 102) (Figueroa et al., 2002) και 62 % σε εργαζόμενους στην επεξεργασία ιχθύων στην Ινδία (n = 87) (Simon & Sanjeev, 2007). Οι μαστοί και οι θηλές των αγελάδων είναι επίσης γνωστές πηγές μόλυνσης, γεγονός που δικαιολογεί την ύπαρξη του βακτηρίου στο μη παστεριωμένο γάλα και τυρί. Οι αμυγδαλές και το δέρμα των χοίρων, καθώς επίσης και το πτέρωμα των πτηνών αποτελούν πιθανές πηγές επιμόλυνσης από *S. aureus* (Stewart, 2003).

Συσχετισμός με τρόφιμα

Η συχνότητα της σταφυλοκοκκικής δηλητηρίασης είναι εποχιακή και αυξάνεται το καλοκαίρι λόγω αυξημένης θερμοκρασίας και ακατάλληλης αποθήκευσης των τροφίμων (Montville & Matthews, 2008). Τα τρόφιμα που θεωρούνται υπεύθυνα είναι το κρέας και τα προϊόντα του, τα πουλερικά και τα προϊόντα αυγών, το γάλα και τα γαλακτοκομικά, οι σαλάτες και τα σάντουιτς. Τα τρόφιμα που απαιτούν εκτεταμένους χειρισμούς και διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μεγάλες περιόδους συχνά εμπλέκονται (Argudin et al., 2010, FDA, 2012).

Συνεπώς, τα προαναφερθέντα βακτήρια που σχετίζονται με τροφιμογενείς λοιμώξεις και τοξινώσεις απαντώνται σε βιοτικές ή αβιοτικές επιφάνειες, έχουν ως πηγή δεξαμενής τον άνθρωπο ή τα ζώα κι αποτελούν παράγοντες επιμόλυνσης τροφίμων. Εκτός του ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι διαδεδομένοι στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων, μπορούν συχνά να επιβιώνουν ή/και να

αναπτύσσονται κάτω από δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος, καθιστώντας την πρόληψη και τον έλεγχο τους στα τρόφιμα ακόμη πιο πολύπλοκο. Επιπλέον, σε αντίθεση με τα αλλοιογόνα βακτήρια, τα παθογόνα απαιτούν συνήθως χαμηλό πληθυσμό για να προκαλέσουν τροφολοίμωξη, υπογραμμίζοντας την αναγκαιότητα για καλές πρακτικές υγιεινής κατά τη διάρκεια χειρισμού των τροφίμων (Bell & Kyriades, 2002, Kathariou, 2002, Nataro & Kaper, 1998, Pui et al., 2011).

Ηλεκτροφόρηση Εναλλασσόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)

Η ανάπτυξη και η απλοποίηση των μοριακών μεθόδων που αφορούν τη μελέτη του γενετικού υλικού έχει οδηγήσει σε μια νέα προσέγγιση στην ταυτοποίηση και τη μελέτη των μικροοργανισμών που βρίσκονται στα τρόφιμα. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στην ανίχνευση, καταγραφή και αξιολόγηση των διαφορών του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών, καθώς υπάρχουν γενετικοί δείκτες που θα μπορούσαν να διαχωρίσουν τους μικροοργανισμούς σε επίπεδο είδους ή ακόμη και στελέχους και να προσδώσουν έτσι διαφορετικές ιδιότητες σε κάθε οργανισμό ακόμη και του ίδιου είδους. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία μεθόδων διαχωρισμού και ταυτοποίησης στελεχών όπως η χρήση της τεχνικής ηλεκτροφόρησης πηκτής αгарόζης εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου (Jonas et al., 2000).

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής εναλλασσόμενου πεδίου είναι μια τεχνική μοριακής δομής που χρησιμοποιείται σε επιδημιολογικές μελέτες σε όλο τον κόσμο. Βασίζεται στη μεταβλητή μετανάστευση μεγάλων περιοριστικών θραυσμάτων DNA (DNA restriction fragments) όταν βρεθούν μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εναλλασσόμενης πολικότητας. Το 1984 οι Schwartz και Cantor περιέγραψαν μια νέα αντίληψη για το διαχωρισμό των τμημάτων DNA που ήταν μεγαλύτερα από 50 χιλιάδες ζεύγη βάσεων (kb). Στη συνέχεια πολυάριθμα μέσα που βασίστηκαν σε αυτή την αρχή αναπτύχθηκαν και αποδείχθηκε η αξία της χρήσης παλμικών πεδίων για το διαχωρισμό τμημάτων DNA από μερικά ζεύγη βάσεων έως και πάνω από 10 εκατομμύρια ζευγών βάσεων (Mb). Τις τελευταίες δεκαετίες η τεχνική αυτή έχει επιφέρει σημαντικές αλλαγές στα πεδία της γενετικής έρευνας όπως η συγκριτική γονιδιωματική βακτηρίων.

Η εφαρμογή PFGE σε διεθνή δίκτυα επιτήρησης όπως το Pulsnet, η διαθεσιμότητα τυποποιημένων πρωτόκολλων για τροφιμογενή παθογόνα, η υψηλή επαναληψιμότητα και διακριτική ικανότητα της την καθιστούν πρότυπη μέθοδο για την ομαδοποίηση μικροοργανισμών σε επίπεδο στελέχους.

Διασταυρούμενη επιμόλυνση

Μεγάλο ποσοστό των τροφιμογενών λοιμώξεων και τοξινώσεων που οφείλονται στα προαναφερθέντα παθογόνα θα μπορούσε να προληφθεί, εάν ακολουθούνταν πιστά οι αρχές ασφάλειας τροφίμων από την παραγωγή έως την κατανάλωσή τους. Η ασφάλεια των τροφίμων αναφέρεται σε όλες τις αρχές που περιγράφουν το χειρισμό, την προετοιμασία και την αποθήκευση των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου της πιθανής επιμόλυνσης ή επιβίωσης παθογόνων μικροοργανισμών. Όλες αυτές οι αρχές συμπεριλαμβάνονται στον Κώδικα τροφίμων (Codex alimentarius) ο οποίος δημοσιεύτηκε από τον FAO-WHO το 2003, ώστε να διασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων. Τα τρόφιμα πριν καταναλωθούν εισέρχονται σε ένα αρκετά πολύπλοκο δίκτυο διακίνησης και διαδικασιών επεξεργασίας, που περιλαμβάνει την παραγωγή των πρώτων υλών, την μεταφορά τους στον τόπο επεξεργασίας, την επεξεργασία τους, την μεταφορά των προϊόντων στους τόπους διανομής κι από εκεί την τελική επεξεργασία στην κουζίνα του καταναλωτή. Συνεπώς, η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί κοινή ευθύνη των παραγωγών, των επιχειρήσεων τροφίμων, των ελεγκτικών αρχών και του τελικού καταναλωτή. Αν και τις τελευταίες δεκαετίες σημαντικές βελτιώσεις ως προς την προσέγγιση για ασφαλή τρόφιμα από το στάβλο στη λιανική πώληση έχουν επιτευχθεί, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το οικιακό περιβάλλον αποτελεί μια σημαντική πηγή τροφιμογενών λοιμώξεων (Neal et al., 2012). Το ποσοστό των τροφιμογενών λοιμώξεων που οφείλονται σε λανθασμένη προετοιμασία σε οικιακό περιβάλλον συχνά υποεκτιμάται, ωστόσο μελέτες το έχουν υπολογίσει μεταξύ 50-87 % (Redmond & Griffith, 2002). Σημαντικοί παράγοντες που μπορεί να συνεισφέρουν σε πρόκληση τροφοδηλητηριάσεων στο σπίτι είναι οι επιμολυσμένες πρώτες ύλες και η έλλειψη γνώσης, από μέρους των καταναλωτών, των βασικών αρχών χειρισμού κατά την προετοιμασία των τροφίμων (Nesbitt et al., 2014). Οι μη ασφαλείς πρακτικές σχετίζονται άμεσα με τρεις διακριτούς τομείς: τον έλεγχο χρόνου/θερμοκρασίας, την προσωπική υγιεινή και τη διασταυρούμενη επιμόλυνση.

Διασταυρούμενη επιμόλυνση ορίζεται ως η μεταφορά επικίνδυνων παραγόντων (μικροβιολογικής, χημικής ή φυσικής προέλευσης) από μια μολυσμένη πηγή σε ένα μη μολυσμένο τρόφιμο με διάφορα μέσα όπως τα χέρια, επιφάνειες του εξοπλισμού, σκεύη ή κατευθείαν από μια πρώτη ύλη σε ένα έτοιμο προς κατανάλωση προϊόν.

Διασταυρούμενη επιμόλυνση σε οικιακό επίπεδο

Η διασταυρούμενη επιμόλυνση αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που σχετίζεται με τις

τροφολοιμώξεις σε οικιακό επίπεδο και συνεπώς θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στη διαχείριση μικροβιολογικής επικινδυνότητας. Σύμφωνα με δεδομένα της Μ. Βρετανίας, η διασταυρούμενη επιμόλυνση ήταν ο κύριος παράγοντας συνεισφοράς σε τροφιμογενείς λοιμώξεις την περίοδο 1999-2000 (WHO, 2000).

Στο πλαίσιο της εκτίμησης μικροβιολογικών κινδύνων, τα στάδια από το στάβλο έως τη βιομηχανία τροφίμων έχουν μελετηθεί εκτενώς και η ανάπτυξη ή η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών μπορεί να υπολογιστεί σε κάθε βήμα εφαρμόζοντας κατάλληλα μοντέλα πρόβλεψης. Όμως όταν το τρόφιμο επέρχεται πλέον στην ευθύνη του καταναλωτή, οι συνθήκες δεν είναι επαρκώς οριοθετημένες. Ωστόσο, το ανεπαρκές μαγείρεμα, η μη κατάλληλη αποθήκευση, η ελλιπής προσωπική υγιεινή και η διασταυρούμενη επιμόλυνση έχουν αναγνωριστεί ως κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την ασφάλεια των τροφίμων σε οικιακό περιβάλλον (Medeiros, 2001). Είναι ωστόσο σε μεγάλο βαθμό άγνωστο πως αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν το τελικό επίπεδο των βακτηρίων τη στιγμή της κατανάλωσης του τροφίμου.

Μικροοργανισμοί μπορούν να ανιχνευθούν σε διάφορες επιφάνειες στην οικιακή κουζίνα (Finch et al., 1978, Rusin et al., 1998, Scott et al., 1982), με αποτέλεσμα αυτή να συνιστά την κύρια πηγή τροφιμογενών λοιμώξεων στο οικιακό περιβάλλον (Teixeira et al., 2007). Ωστόσο, η σημασία αυτού του γεγονότος όσον αφορά τη δημόσια υγεία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του μικροοργανισμού και την πιθανότητα να επιμολύνει τα τρόφιμα (Hilton & Austin, 2000). Οι Haysom & Sharp (2005) μελέτησαν τις μεταβολές στη βακτηριακή επιμόλυνση σε πέντε σημεία κλειδιά σε 10 οικιακές κουζίνες σε περίοδο 24 ωρών. Παρατήρησαν ότι τα επίπεδα επιμόλυνσης κυμαινόταν κατά τη διάρκεια της ημέρας, με το μέγιστο να καταγράφεται μετά την προετοιμασία του γεύματος, ενώ τάση μείωσης αναφέρθηκε κατά τη διάρκεια της νύχτας. Επίσης παρατηρήθηκε έμμεση ένδειξη διασταυρούμενης επιμόλυνσης κυρίως από τα χέρια σε άλλες επιφάνειες, καθώς μέρη όπως τα χερούλια του ψυγείου, η λαβή του βραστήρα και οι βρύσες, τα οποία γενικώς έρχονται σε επαφή μόνο με τα χέρια, έδειξαν υψηλότερα επίπεδα επιμόλυνσης.

Διασταυρούμενη επιμόλυνση σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης

Ακατάλληλος χειρισμός κρέατος έχει αναγνωριστεί ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου για τροφιμογενείς λοιμώξεις σε οικιακό περιβάλλον (Kennedy et al., 2005, Phang & Bruhn, 2011, Redmond et al., 2004). Λανθασμένοι χειρισμοί του ωμού κρέατος οδηγούν άμεσα σε διασταυρούμενη επιμόλυνση τροφίμων και επιφανειών σε οικιακές κουζίνες (Cliver, 2006, Cogan et al., 2002, Zhao et al., 1998). Μελέτες έχουν αποτιμήσει τα επίπεδα βακτηριακής μεταφοράς από ωμό κοτόπουλο στα χέρια (Chen et al., 2001, Montville et al., 2001), από κοτόπουλο σε

πάγκους κοπής (Chen et al., 2001, Kusumaningrum et al., 2004, Van Asselt et al., 2008), από επιμολυσμένα χέρια σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Chen et al., 2001, Montville et al., 2001) και στη βρύση (Chen et al., 2001). Αυτές και άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι βακτήρια μεταφέρονται μεταξύ επιφανειών σε περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων (Chen et al., 2001, Cogan et al., 1999, Cogan et al., 2002, Kusumaningrum et al., 2004, Lubber et al., 2006, Montville et al., 2001) και είναι ικανά να επιβιώνουν στο περιβάλλον, στα χέρια (Chen et al., 2001) και στους πάγκους κοπής (Cliver, 2006, Cogan et al., 1999).

Οι Haysom & Sharp (2005) έδειξαν ότι κάποια σημεία στην κουζίνα όπως οι πάγκοι κοπής, τα χερούλια βρύσης, βραστήρα και ψυγείου επιμολύνονται εύκολα κατά τη διάρκεια προετοιμασίας γεύματος ωμού κοτόπουλου. Διασταυρούμενη επιμόλυνση των οικιακών επιφανειών επίσης έχει βρεθεί από ωμό κρέας και πουλερικά (DeWit et al., 1979, De Boer & Hahne 1990). Μια έρευνα σχετικά με την πιθανότητα διασταυρούμενης επιμόλυνσης με τη χρήση αυγών με κέλυφος επιμολυσμένο με *S. Enteritidis* PT4 έδειξε ότι απλοί χειρισμοί όπως το σπάσιμο και η ανάμιξη των αυγών οδήγησαν σε επιμόλυνση των χεριών, των εργαλείων και των επιφανειών (Humphrey et al., 1994).

Οι De Boer & Hahne (1990), έδειξαν ότι η *Salmonella* και το *Campylobacter* μπορούν εύκολα να μεταφερθούν από το κοτόπουλο σε επιφάνειες τροφίμων, σε μαγειρικά σκεύη, στα χέρια και σε άλλα τρόφιμα. Κατά τη διάρκεια προετοιμασίας κοτόπουλου κατσαρόλας, το *Campylobacter* και η *Salmonella* απομονώθηκαν από ποικιλία άλλων τροφίμων και επιφανειών, ακόμη και μετά τον καθαρισμό των επιφανειών (Cogan et al., 1999). Υψηλά ποσοστά ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών (*Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *S. aureus*) λόγω διασταυρούμενης επιμόλυνσης ανιχνεύθηκαν σε 25 οικιακές κουζίνες, κατά τη διάρκεια προετοιμασίας γεύματος με κοτόπουλο (Gorman et al., 2002).

Διασταυρούμενη επιμόλυνση σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης

Τις τελευταίες δεκαετίες τα πρότυπα διατροφής οδηγούν στην κατανάλωση λαχανικών, ωμών ή ελάχιστα επεξεργασμένων, λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας και των μειωμένων θερμίδων. Αυτή η τάση σε συνδυασμό με την παγκοσμιοποίηση της εμπορίας φρέσκων λαχανικών έχει οδηγήσει στην αύξηση των επιδημιών τροφιμογενών λοιμώξεων που σχετίζονται με τα τρόφιμα αυτά (Lynch et al., 2009). Η ασφάλεια των φρέσκων λαχανικών θέτεται σε κίνδυνο από τη διασταυρούμενη επιμόλυνση που μπορεί να λαμβάνει χώρα, όχι μόνο στις βιομηχανίες αλλά και σε χώρους μαζικής εστίασης και σε οικιακό περιβάλλον. Η διασταυρούμενη επιμόλυνση σε οικιακό περιβάλλον πιθανόν να μην οδηγήσει σε εκτεταμένη επιδημία ωστόσο αποτελεί θέμα

ασφάλειας, καθώς οι ελλειπείς γνώσεις των καταναλωτών και οι λανθασμένες πρακτικές χειρισμού τροφίμων είναι υψίστης σημασίας για την εμφάνιση τροφιμογενών λοιμώξεων σε οικιακό περιβάλλον. Το 1993 ανεξάρτητα περιστατικά διασταυρούμενης επιμόλυνσης μεταξύ ωμού κρέατος και σαλάτας μπουφέ οδήγησε σε επιδημία *E. coli* O157:H7 σε 4 εστιατόρια του Βορειοδυτικού Ειρηνικού (Jackson et al., 2000). Το 2012 μια επιδημία από *S. paratyphi* B στην Β. Καρολίνα είχε ως αιτιολογία διασταυρούμενη επιμόλυνση εξαιτίας της χρήσης κοινών πάγκων κοπής και μαχαιριών για τη χρήση έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων και λαχανικών (CDC, 2013). Έτσι, η διασταυρούμενη επιμόλυνση, επίσης αναφερόμενη ως βακτηριακή μεταφορά, έχει πρόσφατα αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον.

Μελέτες έχουν ερευνήσει όχι μόνο τους υποκείμενους μηχανισμούς που διέπουν τη βακτηριακή μεταφορά, αλλά επίσης παρέχουν ποσοτικά δεδομένα στα γεγονότα διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Kusumaningrum, 2004, Montville & Schaffner, 2003, Silagyi et al., 2009, van Asselt et al., 2008). Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από αυτές τις μελέτες αφορούν το επίπεδο στο οποίο οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ αβιοτικών επιφανειών και τροφίμων λόγω ακατάλληλων χειρισμών σε οικιακό ή σε περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων. Για παράδειγμα, οι Chai et al. (2008), υπολόγισαν τα επίπεδα μεταφοράς του *C. jejuni* σε φυσικά επιμολυσμένα λαχανικά, προσομοιάζοντας διαφορετικά σενάρια χειρισμού που λαμβάνουν χώρα στη κουζίνα κατά τη διάρκεια προετοιμασίας τροφίμων και επισήμαναν το νερό πλυσίματος των λαχανικών και τον πάγκο κοπής ως σημαντική πηγή μεταφοράς του παθογόνου σε άλλα τρόφιμα. Παρόμοια δεδομένα μπορούν επίσης να εξαχθούν από μελέτες που ποσοτικοποιούν τη μεταφορά μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια τεμαχισμού και αφορούν κυρίως τη μεταφορά μικροοργανισμών μεταξύ επιφανειών και φυλλωδών λαχανικών σε οικιακό (Chen et al., 2001, Zilelidou et al., 2015) αλλά και βιομηχανικό επίπεδο (Buchholz, 2012, Luo et al., 2011).

Ο ρόλος της διασταυρούμενης επιμόλυνσης στη μετάδοση τροφιμογενών λοιμώξεων

Σε ανασκόπηση των μηχανισμών μετάδοσης των τροφιμογενών λοιμώξεων, ο Roberts (1990) συμπέρανε ότι αν και οι περισσότερες επιδημίες οφείλονται σε λάθος έλεγχο της θερμοκρασίας συντήρησης των ωμών ή των μαγειρεμένων τροφίμων, πολλές οφείλονται άμεσα ή έμμεσα σε διασταυρούμενη επιμόλυνση. Τα δεδομένα αναφέρουν ότι για το 6 % των τροφιμογενών λοιμώξεων είναι υπεύθυνη η διασταυρούμενη επιμόλυνση και για το 4 % η ανεπαρκής υγιεινή χειρών. Ο Roberts (1986) ανέφερε ότι η διασταυρούμενη επιμόλυνση ήταν ένας συνεισφέρων παράγοντας στο 14 % των επιδημιών σαλμονέλλωσης στη Μεγάλη Βρετανία. Η

πιθανότητα να προκληθεί λοίμωξη μέσω της άμεσης επαφής με επιμολυσμένες επιφάνειες υποστηρίζεται από το γεγονός ότι σχετικά μικρός αριθμός παθογόνων είναι ικανός να προκαλέσει λοίμωξη (Bloomfield & Scott, 1997). Μελέτες σε υγιείς ενήλικες έδειξαν ότι η μολυσματική δόση της *Salmonella* και *E. coli* εξαρτάται από το στέλεχος και μπορεί να κυμαίνεται από 10^2 - 10^3 CFU έως 10^6 - 10^7 CFU (Ferguson & June, 1952, Lipson, 1976, McCullough & Eisele, 1951). Άλλες μελέτες έχουν αναφέρει μολυσματικές δόσεις σε σοκολάτα από 1-6 CFU *S. nima* (Hockin et al., 1989), 60-65 CFU *S. Eastbourne* (Craven et al., 1975) και 50-100 CFU *S. Napoli* (Gill et al., 1988). Μεταξύ 1-6 CFU *S. Typhimurium* από τυρί Cheddar έχουν υπολογιστεί ως μολυσματική δόση για 6 άτομα που ασθένησαν μετά τη κατανάλωση του τυριού (D'Aoust, 1985). Μολυσματικές δόσεις για το *Campylobacter* και *E. coli* O157 υπολογίζονται στα 100-300 και 500 CFU αντίστοιχα (Anonymous, 1994).

Ανάλυση επικινδυνότητας διασταυρούμενης επιμόλυνσης

Από τα δεδομένα που προκύπτουν παρακάτω είναι ξεκάθαρο ότι η διασταυρούμενη επιμόλυνση μέσω περιβαλλοντικών πηγών και επιφανειών συνεισφέρει σημαντικά στις οικιακές τροφιμογενείς λοιμώξεις. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η επικινδυνότητα διασταυρούμενης επιμόλυνσης που σχετίζεται με διαφορετικές επιφάνειες δεν εξαρτάται μόνο από τη συχνότητα της πιθανής ύπαρξης παθογόνων αλλά και από την πιθανότητα μεταφοράς από αυτές τις επιφάνειες (Bloomfield & Scott, 1997).

Συχνότητα επιμόλυνσης σε οικιακό περιβάλλον

Παθογόνοι μικροοργανισμοί ανευρίσκονται συχνά σε επιφάνειες που σχετίζονται με την προετοιμασία τροφίμων (π.χ. χώροι μαζικής εστίασης, οικιακές κουζίνες) (Dawkins et al., 1984, Mendes & Lynch, 1987, Tebutt 1986). Η επιμόλυνση σε οικιακές κουζίνες είναι συνήθως σε χαμηλότερο επίπεδο σε σχέση με τους χώρους μαζικής εστίασης, ωστόσο είδη *Enterobacteriaceae* απομονώνονται ακόμη και από οικιακό περιβάλλον. Μελέτη που αφορούσε 200 οικίες και συμπεριλάμβανε 70 θέσεις δειγματοληψίας, κυρίως στην κουζίνα αλλά και άλλα δωμάτια, επιβεβαίωσε την ύπαρξη πληθυσμών $>10^2$ CFU/cm² βακτηρίων εντερικής προέλευσης και άλλων δυνητικά παθογόνων (Scott et al., 1982). Πληθυσμοί από 10^2 έως 10^6 CFU/cm² απομονώθηκαν από πανάκια κουζίνας υποδεικνύοντας ότι αν και το ωμό κρέας είναι πιθανόν η κύρια πηγή

επιμόλυνσης στη κουζίνα, ο νεροχύτης, οι πάγκοι και τα πανάκια μπορούν να δρουν ως μόνιμη πηγή ή δεξαμενή (Scott & Bloomfield, 1990 b). Στις μισές από τις 73 οικίες όπου υπήρξε λοίμωξη σαλμονέλλωσης απομονώθηκε ο ίδιος ορότυπος από το περιβάλλον (Van Schothorst et al., 1978).

Μεταφορά επιμόλυνσης σε οικιακό περιβάλλον

Η επικινδυνότητα που σχετίζεται με την περιβαλλοντική επιμόλυνση εξαρτάται όχι μόνο από το κατά πόσο ο χώρος έχει επιμολυνθεί, αλλά και από την πιθανότητα να μεταφερθεί στα τρόφιμα, σε άλλες επιφάνειες ή άμεσα από τα χέρια στο στόμα. Η μεταφορά επιμόλυνσης από τις τουαλέτες δεν αποτελεί πρόβλημα εκτός από καταστάσεις υψηλού κινδύνου (π.χ. εντερική λοίμωξη), όπου η πιθανότητα αυξάνεται σημαντικά (Kohn, 1967, Scott, 1990, Scott & Bloomfield, 1985). Τα υγρά πανάκια και τα εργαλεία καθαρισμού αποτελούν αντικείμενα που δρουν ως δεξαμενή παρέχοντας προστασία στους μικροοργανισμούς και παράλληλα συνεισφέρουν στη διασπορά των μικροοργανισμών στα τρόφιμα και σε άλλες καθαρές επιφάνειες (Mackintosh & Hoffman, 1984, Scott & Bloomfield, 1990b, Tebutt, 1986). Όσον αφορά τα χέρια και τις επιφάνειες, λόγω της φύσης της χρήσης τους, η πιθανότητα διασταυρούμενης επιμόλυνσης είναι σταθερά παρούσα. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι δάκτυλα ή τα εργαλεία κουζίνας που έρχονται σε επαφή με στεγνή επιφάνεια μεταφέρουν σημαντικό αριθμό βακτηρίων σε αυτή (Scott & Bloomfield, 1990a).

Ανάλυση αναγκαιότητας απολύμανσης

Όσον αφορά τα πανάκια κουζίνας η πιθανότητα επιμόλυνσης και ο κίνδυνος μετάδοσης είναι αυξημένος. Συνεπώς, κάθε φορά που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να απολυμαίνονται με τον κατάλληλο τρόπο. Για την επαφή με τα χέρια και τις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων η πιθανότητα επιμόλυνσης είναι πιο χαμηλή, ωστόσο είναι σημαντική, ειδικά κατά τη διάρκεια και στο χρόνο μετά την προετοιμασία του φαγητού. Έτσι, είναι σταθερός ο κίνδυνος μετάδοσης επιμόλυνσης από αυτές τις επιφάνειες και επομένως κατάλληλα μέτρα υγιεινής θα πρέπει να λαμβάνονται (Bloomfield & Scott, 1997).

Παράγοντες που επηρεάζουν τη διασταυρούμενη επιμόλυνση

Οι παράγοντες που επιδρούν στη μεταφορά των μικροοργανισμών από μια επιφάνεια σε μια άλλη μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: στους εξωγενείς παράγοντες που σχετίζονται με τις ιδιότητες των επιφανειών και τις συνθήκες του περιβάλλοντος και στους ενδογενείς παράγοντες που αφορούν χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού (Pérez-Rodríguez et al., 2008).

Εξωγενείς παράγοντες

Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες και τα χαρακτηριστικά τόσο της επιφάνειας δότη (επιμολυσμένη) όσο και της επιφάνειας δέκτη έχουν αποδειχθεί από πολλούς συγγραφείς ως σημαντικοί σε σενάρια διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Dawson et al., 2007, Kusumaningrum et al., 2003). Οι κύριοι παράγοντες είναι η διαβρεκτικότητα της επιφάνειας (υδροφοβικότητα, υδροφιλικότητα), η τραχύτητα της επιφάνειας, η παρουσία οργανικού υλικού, το επίπεδο υγρασίας και ο χρόνος επαφής (Dawson et al., 2007, Verran & Whitehead, 2010, Vorst et al., 2006).

Οι Knobben et al. (2007) έδειξαν ότι ο *S. aureus*, ο οποίος έχει υδρόφιλη επιφάνεια μεταφέρεται σε υδρόφιλες επιφάνειες (π.χ. γυαλί) εύκολα, αλλά έχει χαμηλή μεταφορά από εκεί σε άλλες επιφάνειες λόγω της ισχυρής προσκόλλησης στην επιφάνεια. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα βακτήρια τείνουν να προσκολλώνται καλύτερα σε υδρόφοβα υλικά (π.χ. καουτσούκ) οδηγώντας σε μειωμένο αριθμό βακτηρίων ικανών για μεταφορά (Foong & Dickson, 2004).

Κάποιες άλλες μελέτες βακτηριακής μεταφοράς έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ τραχύτητας και μεταφοράς, με την αυξημένη τραχύτητα της επιφάνειας να δότη οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα μεταφοράς από αυτή (Dawson et al., 2007, Knobben et al., 2007). Η τραχύτητα επίσης επηρεάζει και τη μεταφορά στην επιφάνεια δέκτη, αλλά σε μικρότερη έκταση. Ο ρόλος της τραχύτητας εξηγείται από την παρατήρηση ότι τα βακτήρια αποικίζουν και παγιδεύονται σε σημεία με ρωγμές κι έτσι δεν είναι διαθέσιμα για μεταφορά (Dawson et al., 2007). Διάβρωση και αμυχές στις επιφάνειες οδηγούν επίσης σε χαμηλά επίπεδα μεταφοράς.

Η παρουσία οργανικού υλικού μπορεί να μεταβάλει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας και να επηρεάζει την προσκόλληση των βακτηρίων και τα επίπεδα μεταφοράς. Σε αντίθεση με την άποψη ότι τα υπολείμματα τροφίμων διευκολύνουν την προσκόλληση των βακτηρίων στις επιφάνειες, οι υδατικές επιστρώσεις ζωικής προέλευσης (π.χ. εκχυλίσματα κοτόπουλου και βακαλάου) φάνηκε να μειώνουν την προσκόλληση σε αβιοτικές επιφάνειες των *E.*

coli, *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *S. Enteritidis* (Bernbom et al., 2009).

Υπάρχει μια φαινομενικά θετική επίδραση της μηχανικής πίεσης στη βακτηριακή μεταφορά σύμφωνα με τα ευρήματα των Kusumaningrum et al. (2003), καθώς υψηλές πιέσεις θα απέφεραν μικρότερες αποστάσεις μεταξύ των επιφανειών που έρχονται σε επαφή, οδηγώντας σε πιθανές ενώσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιφανειών και βακτηρίων.

Γενικά αναμένεται ότι η βακτηριακή μεταφορά αυξάνει με το πέρασμα του χρόνου επαφής (Dickson & Daniels, 1991, Guðbjörnsdóttir et al., 2005). Οι Dickson & Daniels (1991) πρότειναν ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επαφής δύο επιφανειών τόσο πιο μεγάλος είναι ο αριθμός ενώσεων και αλληλεπιδράσεων που μπορεί να συμβούν με την επιφάνεια δέκτη με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο επίπεδο μεταφοράς.

Το επίπεδο υγρασίας είναι καθοριστικής σημασίας για τη μικροβιακή μεταφορά και τη διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ των επιφανειών. Οι Patrick et al. (1997) παρατήρησαν ότι η παραμένουσα υγρασία στα χέρια προσδιόρισε τα επίπεδα των βακτηρίων που μεταφερόταν στην επιδερμίδα, στα τρόφιμα και στις επιφάνειες επεξεργασίας με τον αριθμό των βακτηρίων που μεταφέρονται από θέση σε θέση να μειώνεται όταν αέρας στεγνώματος ή σκούπισμα με πετσέτα εφαρμοζόταν στα χέρια, μετά το πλύσιμο. Οι Sattar et al. (2001) επίσης ανέφεραν ότι η μεταφορά των βακτηρίων από υγρά υφάσματα σε επιφάνειες με υγρασία ήταν πάντα υψηλότερη σε σχέση με τις αντίστοιχες στεγνές επιφάνειες.

Ενδογενείς παράγοντες

Ενδογενείς παράγοντες που εξαρτώνται και χαρακτηρίζουν άμεσα το είδος ή το στέλεχος του βακτηρίου είναι επίσης σημαντικοί για τη μετάφορα των προσκολλημένων βακτηρίων ή των βιοϋμενικών κυττάρων μεταξύ των επιφανειών. Τα χημικά σήματα και τα ένζυμα που εκκρίνονται από μικτά βιοϋμενία όπως το *cis*-2-δεκενοϊκό οξύ (*cis*-2-decenoic acid) που παράγεται από την *P. aeruginosa*, έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνουν την αποκόλληση των κυττάρων και κατά συνέπεια τη διασπορά ή τη μεταφορά τόσο Gram αρνητικών όσο και Gram θετικών βακτηρίων (Davies & Marques, 2009). Επίσης εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες που παράγονται από την *P. aeruginosa* έχουν βρεθεί να επιδεικνύουν δραστηριότητα εναντίον των βιοϋμενίων του σταφυλόκοκκου (Qin et al., 2009).

Μερικές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η ικανότητα μεταφοράς εξαρτάται από το στέλεχος των βακτηρίων και σχετίζεται με τις διαφορές στα χαρακτηριστικά προσκόλλησης των

βακτηρίων (Knobben et al., 2007). Οι Rusin et al., (2002) παρατήρησαν διαφορετικά επίπεδα μεταφοράς μεταξύ του Gram αρνητικού βακτηρίου *Serratia rubidea* και του Gram θετικού βακτηρίου *Micrococcus luteus* από επιφάνειες στα χέρια και από αυτά στα τρόφιμα. Οι Kusumaningrum et al., (2003) επίσης παρατήρησαν διαφορετικά επίπεδα μεταφοράς της *S. Enteritidis*, *S. aureus* και *C. jejuni* από σπόγγους κουζίνας σε επιφάνειες ανοξειδώτου χάλυβα και από εκεί σε επιφάνειες αγγουριού. Μελέτες των Montville & Schaffner, (2003) έδειξαν ότι το μέγεθος του αρχικού ενοφθαλμισμού έχει στατιστικώς σημαντική επίδραση στην ικανότητα μεταφοράς. Αυτοί οι συγγραφείς παρατήρησαν μια αρνητική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του αρχικού ενοφθαλμισμού στην πηγή και το επίπεδο μεταφοράς για σχεδόν όλα τα δεδομένα. Οι Sheen & Hwang, (2010) παρατήρησαν ότι στα υψηλά επίπεδα αρχικού ενοφθαλμισμού τα επίπεδα μεταφοράς της *E. coli* θα μπορούσαν να προβλεφθούν με μαθηματικά μοντέλα, αλλά δεν ισχύει το ίδιο για τα χαμηλά επίπεδα ενοφθαλμισμού.

Τα επίπεδα αρχικού ενοφθαλμισμού έχουν βρεθεί επίσης να επηρεάζουν τη μεταφορά βακτηρίων από επιμολυσμένα προϊόντα κρέατος και ιχθύος σε μη επιμολυσμένα προϊόντα κατά τη διάρκεια τεμαχισμού και κιμαδοποίησης (Aarnisalo et al., 2007, Papadopoulou et al., 2012). Η επίδραση κάποιων εξωγενών παραγόντων μπορεί να εξαρτάται από κάποιους ενδογενείς παράγοντες ειδικούς του κάθε στελέχους. Για παράδειγμα, ο αυξημένος χρόνος επαφής αυξάνει την πιθανότητα να εντείνονται οι όποιες διαφορές μεταξύ των ειδών των βακτηρίων λόγω των διαφορών στη διαδικασία προσκόλλησης και την ικανότητα παραγωγής εξωπολυσακχαριτών ή την παρουσία εξωκυτταρικών δομών (Dickson & Daniels, 1991, Midelet et al., 2006). Αντίθετα, τα υψηλά επίπεδα υγρασίας μειώνουν τις διαφορές ως προς την μεταφορά μεταξύ των ειδών, καθώς η προσκόλληση ελαττώνεται παρουσία υγρασίας (Knobben et al., 2007, Midelet et al., 2006).

Πρόληψη διασταυρούμενης επιμόλυνσης

Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις αύξησαν την ανάγκη για υγιεινή σε οικιακό επίπεδο. Στην πράξη, η καθαριότητα δεν είναι το μόνο σημαντικό θέμα. Η γνώση της πρόληψης της διασταυρούμενης επιμόλυνσης είναι επίσης σημαντική. Η αποτελεσματική υγιεινή σε οικιακό επίπεδο είναι ένα σύνολο μέτρων που αποσκοπούν στην πρόληψη της επιμόλυνσης των τροφίμων από παθογόνα, με σκοπό την αποφυγή τροφιμογενών λοιμώξεων. Αυτά τα μέτρα συμπεριλαμβάνουν την υγιεινή των επιφανειών κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας των τροφίμων καθώς επίσης και την προσωπική υγιεινή.

Η απλή προσωπική υγιεινή με χρήση²⁷ σαπουνιού ήταν μια επιτυχία της δημόσιας

υγιεινής στην εποχή πριν την εμφάνιση των απολυμαντικών (Levy, 2001). Η επέκταση του προσδόκιμου της ζωής στο πρώτο μισό του εικοστού αιώνα θα μπορούσε να αποδοθεί στη βελτίωση της προσωπικής υγιεινής, που οδήγησε στη μείωση των λοιμωδών νοσημάτων. Έπειτα εμφανίστηκαν τα απολυμαντικά που επέδρασαν επίσης θετικά στη δημόσια υγεία.

Όμως λόγω της αυξημένης προσέλευσης της προσοχής των μέσων μαζικής ενημέρωσης ως προς τους επικίνδυνους για τη δημόσια υγεία μικροβιολογικούς παράγοντες, το κοινό υιοθέτησε έναν νέο ορισμό του «καθαρού». Δεν αρκούσε η απλή απομάκρυνση των λεκέδων και υπολειμμάτων τροφίμων αλλά οι επιφάνειες θα έπρεπε να είναι απαλλαγμένες μικροοργανισμών (Levy, 2001). Το γεγονός αυτό υποκινήθηκε από την προώθηση αντιβακτηριακών προϊόντων που προάγουν τον περιορισμό των μικροοργανισμών από το οικιακό περιβάλλον και τον άνθρωπο. Διάφορες συζητήσεις ξεκίνησαν για τον προσδιορισμό του επιπέδου καθαρισμού που θεωρείται ως ικανοποιητικό από άποψη οικιακής υγιεινής. Το στέγνωμα των επιφανειών και η χρήση απορρυπαντικών θα μπορούσε να οδηγήσει στη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού. Αλλά το στέγνωμα των επιφανειών από μόνο του δεν μπορεί να εγγυηθεί την πρόληψη της μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών από τις οικιακές επιφάνειες και η μείωση των βακτηρίων λόγω χρήσης απορρυπαντικών είναι παροδική αν οι επιφάνειες διατηρούν την υγρασία τους (Scott & Bloomfield, 1990). Αν ένα υψηλό επίπεδο μείωσης των μικροοργανισμών από τα σφουγγάρια ή τα πανάκια είναι το ζητούμενο, η διαβροχή τους με διάλυμα χλωρίνης ή η θέρμανσή τους σε φούρνο μικροκυμάτων ή ο εμποτισμός τους σε βραστό νερό για 5 min θα μπορούσε να υιοθετηθεί (Ikawa & Rossen, 1999). Η θέρμανση είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος απολύμανσης αν και δεν είναι εύκολα εφαρμόσιμος σε μεγάλες επιφάνειες (Beumer et al., 1999).

Η χρήση χημικών απολυμαντικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απολύμανση επιφανειών όταν οι προηγούμενες μέθοδοι δεν είναι εφαρμόσιμες ή κρίνονται ως ανεπαρκείς σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Ωστόσο η επίδραση των απολυμαντικών μπορεί να είναι μειωμένης διάρκειας και η επαναμόλυνση αυτών των επιφανειών μπορεί να συμβεί γρήγορα ως αποτέλεσμα επεξεργασίας επιμολυσμένων πρώτων υλών ή ανάπτυξης των μικροοργανισμών που πιθανόν έχουν διαφύγει του καθαρισμού, παρουσία υγρασίας.. Ενώ η αποτελεσματική υγιεινή είναι αδιαμφισβήτητη απαραίτητη, η εντατική χρήση απολυμαντικών σε οικιακό επίπεδο ίσως δεν είναι απαραίτητη, εν αντιθέσει με το νοσοκομειακό περιβάλλον (Green, 2001, Levy, 2001). Η χρήση τους ωστόσο θα πρέπει να κατέχει ρόλο στα πλαίσια της γενικής υγιεινής στο οικιακό περιβάλλον. Το 2000, οδηγίες σχετικά με την οικιακή υγιεινή θεσπίστηκαν για να ανταποκριθούν στην ανάγκη για βελτίωση των γνώσεων και των πρακτικών υγιεινής των καταναλωτών (IFH, 2004). Οι οδηγίες αυτές βασίζονται στην αρχή της διαχείρισης της επικινδυνότητας και πρόληψη μικροβιολογικού

κινδύνου. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των μέτρων πρόληψης της διασταυρούμενης επιμόλυνσης θα πρέπει συνεχώς να αποτιμάται και οι οδηγοί υγιεινής θα πρέπει να ανανεώνονται συνεχώς με νέα δεδομένα ώστε να επιτυγχάνεται η πρόληψη της έκθεσης των καταναλωτών σε τροφιμογενή παθογόνα.

Μείωση του μικροβιακού φορτίου σε οικιακό περιβάλλον

Όσον αφορά τις οικιακές τροφιμογενείς επιμολύνσεις σημαντικό ποσοστό τους θα μπορούσε να προληφθεί με τη χρήση σωστού καθαρισμού ή απολύμανσης, που μπορούν να επιτευχθούν με πολλούς τρόπους όπως το στέγνωμα, ο καθαρισμός με νερό και σαπούνι, καθώς επίσης και με θέρμανση ή χρήση χημικών παραγόντων.

Στέγνωμα επιφανειών

Μελέτες έχουν αποδείξει την βακτηριοκτόνο δράση του στεγνώματος των επιφανειών, ωστόσο η αποτελεσματικότητά του εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού, τα επίπεδα υγρασίας και τα υπολείμματα τροφίμων (Hirai, 1991, McEldowney & Fletcher, 1988, Petit & Lowburry, 1968, Rathmachers & Borneff, 1977). Αν και το στέγνωμα κατέχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των βακτηρίων σε χαμηλό επίπεδο, έχει αποδειχθεί ότι οι οργανισμοί που στεγνώνουν σε αβιοτικές επιφάνειες μπορούν να επιβιώσουν για περιόδους άνω των 4 ωρών, χρόνο ικανό για την μεταφορά τους σε άλλες επιφάνειες (Scott & Bloomfield, 1990a). Για επιμολυσμένα πανάκια καθαρισμού παρατηρείται όχι μόνο επιβίωση αλλά και πολλαπλασιασμός Gram αρνητικών βακτηρίων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, κυρίως όταν διατηρούν την υγρασία τους (Scott & Bloomfield, 1990b). Η *S. Enteritidis* μπορεί να επιβιώσει περισσότερο από 24 h σε επιφάνειες που ήρθαν σε επαφή με επιμολυσμένα αυγά (Humphrey et al., 1994).

Χρήση νερού και σαπουνιού

Σε ορισμένες περιπτώσεις, για παράδειγμα κατά τη διάρκεια προετοιμασίας και κατανάλωσης τροφίμων, επαρκής απολύμανση των μαγειρικών σκευών και χεριών μπορεί να επιτευχθεί με χρήση σαπουνιού και ξέπλυμα με νερό. Όμως καθώς ο τρόπος δράσης του σαπουνιού σχετίζεται κυρίως με μηχανική απομάκρυνση ο συνδυασμός με τη διαδικασία ξέπλυματος είναι

απαραίτητος. Εργαστηριακές μελέτες έδειξαν ότι μόνο το σκούπισμα των επιφανειών με νερό και σαπούνι οδήγησε σε εξάπλωση των βακτηρίων σε όλη την επιφάνεια και στο πανί καθαρισμού με αποτέλεσμα να διασπαρθούν σε νέες επιφάνειες (Scott et al., 1984, Scott & Bloomfield, 1990a). Χειρισμός αυτών τεχνητά επιμολυσμένων με *S. Enteritidis*, οδήγησε σε επιμόλυνση σκευών και χεριών, στα οποία ανιχνεύθηκε ο μικροοργανισμός ακόμη και μετά τον καθαρισμό τους με απορρυπαντικό ή σαπούνι και ζεστό νερό, αντίστοιχα (Humphrey et al., 1994). Κατά τη διάρκεια προετοιμασίας κοτόπουλου επιμολυσμένου με *E. coli* K12, ο μικροοργανισμός απομονώθηκε από επιφάνειες όπως πάγκοι κοπής, ρούχα και νεροχύτες ακόμη και μετά το πλύσιμο (Dewit et al., 1979).

Χρήση χημικών απολυμαντικών

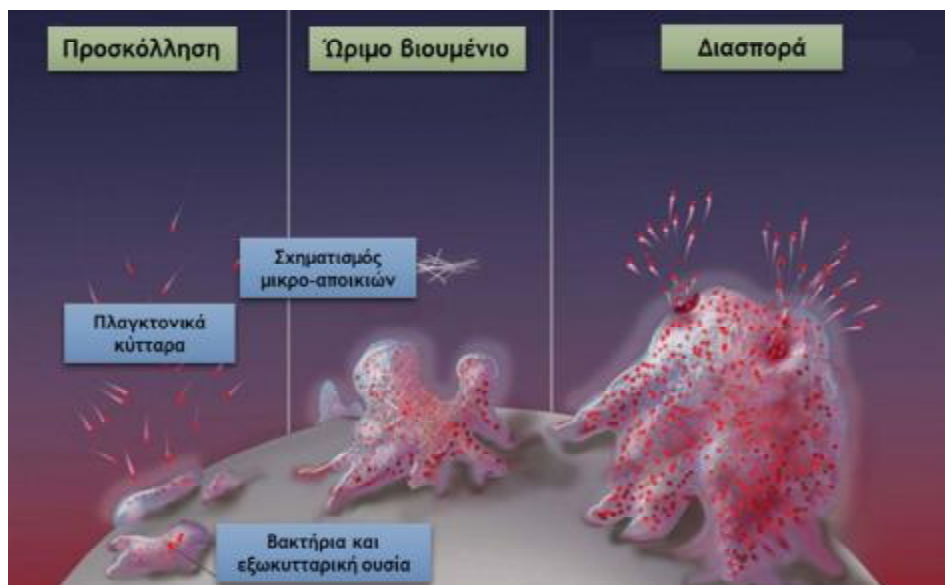
Σε οικιακό περιβάλλον όταν απαιτείται άμεση και αποτελεσματική απολύμανση κι όταν το βράσιμο ή η χρήση σαπουνιού και νερού είναι αναποτελεσματικά ή μη εφικτά η απολύμανση επιτυγχάνεται με τη χρήση χημικού απολυμαντικού. Η αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών ελέγχεται με εργαστηριακούς ελέγχους ή μελέτες που διεξάγονται κάτω από συνθήκες χρήσης, ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις και χρόνοι επαφής. Σε μια συγκριτική μελέτη ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα του καθαρίσματος με νερό και σαπούνι ή η εφαρμογή φαινολικού και υποχλωριώδους απολυμαντικού (Scott et al., 1984). Η δειγματοληψία εφαρμόστηκε με τη χρήση τρυβλίων 25 cm². Πριν την εφαρμογή καθαρισμού, ποσοστό 56-63 των σημείων δειγματοληψίας βρέθηκαν επιμολυσμένα με άνω των 100 CFU/cm². Μετά τον καθαρισμό με σαπούνι και νερό χωρίς όμως ξέπλυμα το ποσοστό των επιμολυσμένων σημείων ανήλθε στο 68 %. Η εφαρμογή φαινολικού ή υποχλωριώδους απολυμαντικού αύξησε σημαντικά το ποσοστό των «καθαρών» σημείων (<10 CFU/cm²) σε 38 % και 76 % αντίστοιχα. Η σχέση μεταξύ βακτηριακής επιμόλυνσης των επιφανειών επεξεργασίας και των υφασμάτων καθαρισμού μετά την πρωινή επεξεργασία τροφίμων σε κουζίνα κολλεγίου μελετήθηκε και από τους Scott & Bloomfield (1993). Στα πανάκια στα οποία χρησιμοποιήθηκε μόνο απορρυπαντικό ήταν επιμολυσμένα με υψηλούς πληθυσμούς τόσο κατά τη διάρκεια προετοιμασίας των γευμάτων, όσο και μετά την διαδικασία καθαρισμού. Παρατηρήθηκε αύξηση στον πληθυσμό των μικροοργανισμών μετά τον καθαρισμό σε σχέση με τη δειγματοληψία που διενεργήθηκε αμέσως μετά την προετοιμασία των τροφίμων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μεταφορά της επιμόλυνσης από υφάσματα στις επιφάνειες λόγω της διαδικασίας καθαρισμού. Αντίθετα όταν τα υφάσματα είχαν ως απολυμαντικό τεταρτοταγή βάση αμμωνίου η επιμόλυνση τόσο των επιφανειών όσο και των υφασμάτων βρέθηκε ότι ήταν

χαμηλότερη .

Βιοϋμένια

Ένας σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με γεγονότα διασταυρούμενης επιμόλυνσης αποτελούν τα παθογόνα βακτήρια που παραμένουν στις αβιοτικές επιφάνειες ως αποτέλεσμα επεξεργασίας επιμολυσμένων πρώτων υλών, από χειριστές-φορείς μολυσματικών παραγόντων κι από ανεπαρκείς διαδικασίες καθαρισμού και απολύμανσης των επιφανειών. Τα βακτήρια, επομένως, εναποτίθενται στις επιφάνειες και σχηματίζουν βιοϋμένια που αποτελούνται από διάφορα είδη και στελέχη μικροοργανισμών. Τα βιοϋμένια είναι ζωτικής σημασίας για την ασφάλεια των τροφίμων καθώς, αφού εγκατασταθούν σε μια επιφάνεια, ευθύνονται για επανειλημμένα επεισόδια διασταυρούμενης επιμόλυνσης μέσω αποκόλλησης κυττάρων από τα εξωτερικά στρώματα του βιοϋμενίου.

Το βιοϋμένιο ορίζεται ως μικροβιακή κοινότητα που αποτελείται από κύτταρα που προσκολλώνται σε υπόστρωμα ή δι-επιφάνεια ή μεταξύ τους, ενσωματωμένα σε πολυμερή εξωκυττάρια ουσία (extracellular polymeric substance), την οποία αυτό-παράγουν και επιδεικνύουν ένα διαφοροποιημένο φαινότυπο όσον αφορά το επίπεδο ανάπτυξης και την έκφραση των γονιδίων (Corteston et al., 1995, Donlan & Costerton, 2002, Lazazzera, 2005). Ο σχηματισμός βιοϋμενίου είναι ένα σύνηθες φαινόμενο, όπου, ουσιαστικά κάθε υλικό που έρχεται σε επαφή με υγρό και μια μολυσματική πηγή καλύπτεται άμεσα με βακτήρια (Corteston et al., 1987, Corteston et al., 1994). Ο σχηματισμός βιοϋμενίων είναι μια δυναμική διαδικασία με μια σειρά διακριτών σταδίων ανάπτυξης που συμπεριλαμβάνει την αρχική προσκόλληση στην επιφάνεια, το σχηματισμό μικρο-αποικιών, την μετάβαση των μικρο-αποικιών σε ώριμο βιοϋμένιο που εσωκλείεται σε εξωπολυσακχαρίτες και τελικά την αποκόλληση και το διασκορπισμό των κυττάρων (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2. Κύκλος ζωής του βιοϋμένιου με τα στάδια προσκόλλησης, σχηματισμού ώριμου βιοϋμένιου και διασποράς των κυττάρων του από τα εξωτερικά στρώματα (Wixtrom et al., 2012)

Κύκλος ζωής βιοϋμένιου

Προσκόλληση κυττάρων

Στάδια προσκόλλησης κυττάρων

A) Σχηματισμός conditioning film

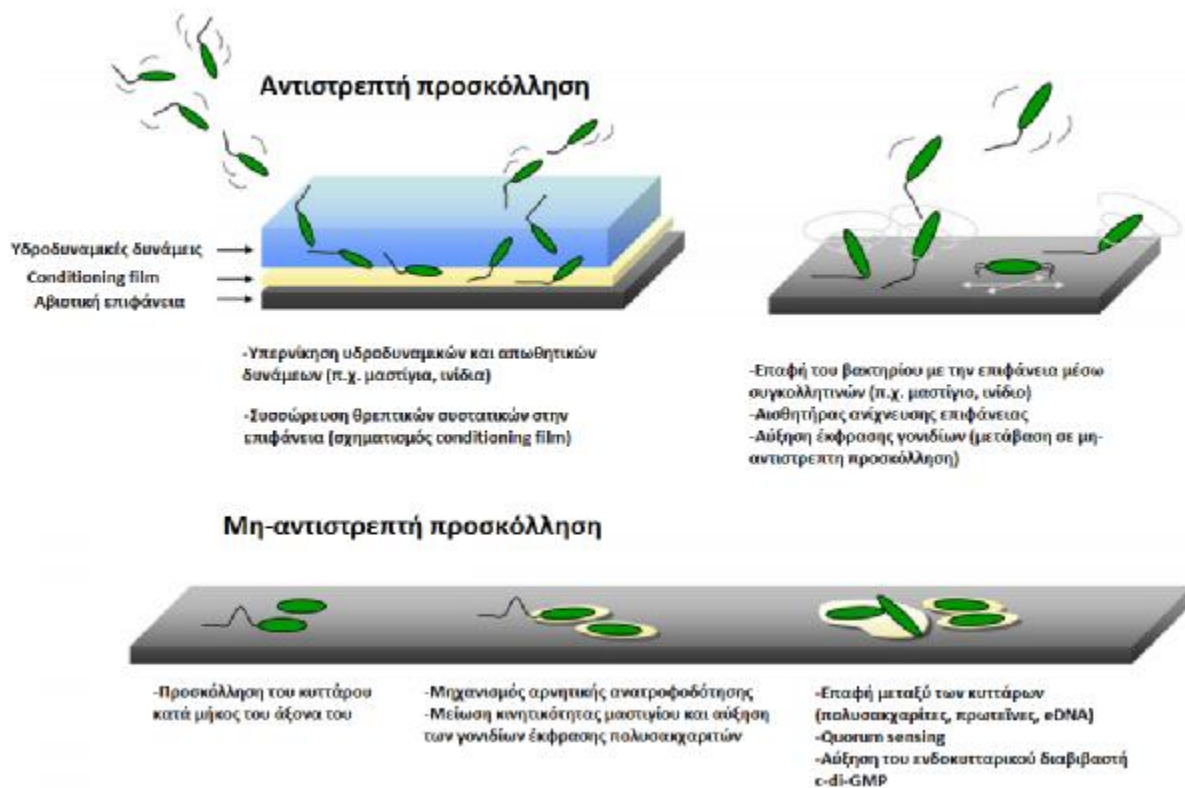
Όσον αφορά την προσκόλληση, η ίδια η επιφάνεια παρέχει στα βακτήρια ένα πλεονέκτημα σε σχέση με το υγρό που την περιβάλλει, όπως και κάθε επιφάνεια, ανεξάρτητα από τις χημικές ή φυσικές ιδιότητες, απορροφά (μακρο) μόρια. Αυτή η στιβάδα, που αναφέρεται ως conditioning film, όχι μόνο αλλάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας, αλλά επίσης συμβάλλει στη συσσώρευση πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών και άλλων μορίων στην επιφάνεια παρέχοντας ένα ευνοϊκό μεταβολικό περιβάλλον για τα βακτηριακά κύτταρα και να χρησιμεύοντας ως εκκίνηση για την προσκόλληση των κυττάρων (Donlan, 2001).

B) Αντιστρεπτή προσκόλληση

Η αρχική προσκόλληση στις επιφάνειες είναι αντιστρεπτή και οφείλεται στη μεταφορά

των πλαγκτονικών μικροβιακών κυττάρων σε εγγύτητα με μια επιφάνεια. Η βακτηριακή μεταφορά μπορεί να είναι παθητική ή ενεργητική. Η παθητική μεταφορά επιτυγχάνεται με φυσικούς μηχανισμούς όπως η κίνηση Brownian, η βαρύτητα και οι υδροδυναμικές δυνάμεις του υγρού. Η ενεργητική μεταφορά κατευθύνεται από οργανίδια της επιφάνειας όπως μαστίγια, τριχίδια, ινίδια κ.ά. Μόλις το βακτήριο έρθει σε κοντινή επαφή με την επιφάνεια (<1 nm) η τελική προσκόλληση εξαρτάται από καθαρό άθροισμα των δυνάμεων έλξης και απώθησης μεταξύ της επιφάνειας του κυττάρου και του υποστρώματος. Αυτές οι δυνάμεις συμπεριλαμβάνουν δυνάμεις van der Waals, ηλεκτροστατικές δυνάμεις και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (Chmielewski & Frank, 2003).

Στην αντιστρεπτή προσκόλληση, τα κύτταρα προσκολλούνται χαλαρά στις επιφάνειες και μπορούν άμεσα να αποκολληθούν και να επιστρέψουν στην πλαγκτονική φάση (**Εικόνα 3**). Το μαστίγιο και τα ινίδια του κυττάρου βοηθούν το βακτήριο ώστε να έρθει σε επαφή με την επιφάνεια και να υπερνικήσει τις υδροδυναμικές και απωθητικές δυνάμεις που οφείλονται στο συνολικό καθαρό αρνητικό ηλεκτροστατικό φορτίο μεταξύ των βακτηρίων και της επιφάνειας (Goulter et al., 2009, Pratt & Kolter, 1999). Σε αυτό το στάδιο τα κύτταρα μπορούν να σπινάρουν, να δονούνται ή να μετακινούνται κατά μήκος της επιφάνειας. Το σπινάρισμα είναι μια ένδειξη της προσκόλλησης του μαστιγίου στην αβιοτική επιφάνεια ως προς τον ένα πόλο και της περιστροφή του βακτηρίου γύρω από τον άξονα του (Sauer et al., 2002, Toutain et al., 2007). Επιπροσθέτως της κίνησης Brownian, στα βακτηριακά κύτταρα παρατηρείται μια σπασμωδική κίνηση που ονομάζεται συσπαστική κίνηση (twitching motility), που οφείλεται στα ινίδια.



Εικόνα 3. Επισκόπηση των γεγονότων και των παραγόντων που επιδρούν στην αντιστρεπτή και μη προσκόλληση των κυττάρων στις επιφάνειες (Petrova & Sauer, 2012)

Γ) Μη αντιστρεπτή προσκόλληση

Η μετάβαση από την αντιστρεπτή στη μόνιμη προσκόλληση επιτυγχάνεται με την παραγωγή εξωκυτταρικής ουσίας. Η εξωκυτταρική ουσία είναι βιο-συνθετικά πολυμερή που διαφέρουν σημαντικά ως προς τη χημική τους σύνθεση ανάλογα με το είδος του βακτηρίου και μπορεί να συμπεριλαμβάνει πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, εξωκυτταρικό DNA (eDNA) και φωσφολιπίδια (Wingender et al., 1999). Εκτός από την εξωκυτταρική ουσία, διάφορα πρωτεϊνικά οργανίδια όπως τριχίδια και μαστίγια έχουν βρεθεί να συνεισφέρουν στην μόνιμη φάση προσκόλλησης (Stoodley et al., 2002).

Έχει τεκμηριωθεί ότι η παρουσία eDNA βοηθά στην προσκόλληση των κυττάρων στις αβιοτικές επιφάνειες, καθώς η χρήση του ενζύμου DNAase μείωσε σημαντικά το σχηματισμό βιομενίου της *Pseudomonas aeruginosa* και φαίνεται να συνεισφέρει κυρίως στη

συγκράτηση των κυττάρων μεταξύ τους σε νεοσχηματιζόμενα βιουμένια σε σχέση με τα ώριμα (Matsukawa et al., 2004, Whitchurch et al., 2002).

Μελέτες έχουν παρατηρήσει σύνδεση μεταξύ των μαστιγίων και της παραγωγής πολυσακχαριτών, δείχνοντας ότι το μαστίγιο αποτελεί έναν μηχανικό αισθητήρα πρόσφυσης του κυττάρου με την επιφάνεια, που ενεργοποιεί συμβάντα που αφορούν μείωση της κινητικότητας και έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση πολυσακχαριτών, οδηγώντας σε μια πιο σταθερή και μη-αντιστρεπτή σχέση με την επιφάνεια (Boles & McCarter, 2002, Li et al., 2012). Έχει βρεθεί λοιπόν ότι η κινητικότητα του μαστιγίου έχει επίδραση στο σχηματισμό του βιουμενίου μέσω ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης στη ρύθμιση της παραγωγής πολυσακχαριτών.

Συνεπώς, αυξημένη έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή πολυσακχαριτών (π.χ. algC), είναι ενδεικτική στα κύτταρα που μεταβαίνουν στην αντιστρεπτή φάση προσκόλλησης (Davies & Geesey, 1995). Επίσης, έχει φανεί ότι αυτές οι αλλαγές συνδέονται άμεσα με αύξηση του ενδοκυτταρικού διαβιβαστή, κυκλική μονοφωσφορική γουανωσίνη (bis-(3'-5')-cyclic di-GMP, c-di-GMP) (Cotter et al., 2007, Hengge, 2009). Υψηλά επίπεδα c-di-GMP σχετίζονται με τη μετάβαση των κυττάρων από την κινήτη φάση στην προσκόλληση στις επιφάνειες (D'Argenio & Miller, 2004, Jenal, 2004). Η ρύθμιση του c-di-GMP επίσης συνδέεται με τη διασπορά των κυττάρων του βιουμενίου (Baraud et al., 2007, Gjermansen et al., 2010).

Επίσης, όταν τα κύτταρα εγκατασταθούν στην επιφάνεια και αποκτήσουν συνδέσεις μεταξύ τους επικοινωνούν με το διακυτταρικό μηχανισμό αίσθησης απαρτίας (quorum sensing), σύμφωνα με τον οποίο τα βακτήρια χρησιμοποιούν την παραγωγή και την ανίχνευση των εξωκυτταρικών χημικών ουσιών που ονομάζονται αυτεπαγωγείς για την παρακολούθηση του πληθυσμού τους στο βιοϋμένιο (Camilli & Bassler, 2006).

Παράγοντες που επηρεάζουν την προσκόλληση των παθογόνων σε επιφάνειες τροφίμων

Η προσκόλληση των παθογόνων σε επιφάνειες εξαρτάται από παράγοντες που αφορούν τις επιφάνειες (π.χ. τύπος και φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας, παρουσία υπολειμμάτων τροφίμων κ.ά.), τις συνθήκες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, υγρασία, pH) και παράγοντες που σχετίζονται με τον ίδιο τον μικροοργανισμό (στέλεχος, μικτά βιοϋμένια κ.ά.) (Manios et al., 2014).

Ο τύπος της επιφάνειας

Κάθε επιφάνεια υποστηρίζει ανάπτυξη βιοϋμενίου όταν μικροοργανισμοί είναι παρόντες (Kumar & Anand, 1998). Όμως οι ιδιότητες της επιφάνειας προσκόλλησης σε συνδυασμό με την επιφάνεια του βακτηρίου επηρεάζουν το χρόνο που απαιτείται για την προσκόλληση και τη δύναμη του σχηματισμού βιοϋμενίων (Kumar & Anand, 1998, Poulsen, 1999, van Houdt & Michiels, 2010). Τα συνήθη υλικά που χρησιμοποιούνται σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων είναι το πλαστικό, το γυαλί, ο ανοξείδωτος χάλυβας, το ξύλο και έχουν ιδιότητες όπως τραχύτητα, ευκολία καθαρισμού, απολύμανσης και διαβρεξιμότητα, που προσδιορίζεται με την υδροφοβικότητα του υλικού και μπορεί να επηρεάσουν τη δύναμη της προσκόλλησης των κυττάρων (Van Houdt & Michiels, 2010). Η προσκόλληση διευκολύνεται από υψηλή ελεύθερη ενέργεια και επιφάνειες με υγρασία. Οι γυάλινες επιφάνειες γενικά προωθούν την προσκόλληση εξαιτίας της υψηλής ελεύθερης ενέργειας και της υδρόφιλης τους φύσης σε αντίθεση με το τεφλόν, το νάιλον, το καουτσούκ και τα πολυμερή, τα οποία θεωρούνται υδρόφοβα (Chmielewski & Frank, 2003, Shi & Zhu, 2009). Πειράματα ικανότητας προσκόλλησης 25 στελεχών *Salmonella* spp. σε τέσσερις επιφάνειες υλικών έδειξαν ότι η προσκόλληση ήταν μεγαλύτερη σε επιφάνειες πιο θετικές στην ελεύθερη ενέργεια (Chia et al., 2009). Η μελέτη της επίδρασης του υλικού ανάμεσα σε οκτώ επιφάνειες σε οικιακό περιβάλλον αναφορικά με την ικανότητα προσκόλλησης 10 στελεχών *L. monocytogenes*, έδειξε ότι η καλύτερη προσκόλληση επιτεύχθηκε στο όριο μεταξύ υδροφοβικότητας και υδροφιλικότητας (Silva et al., 2008). Επιπλέον, το πολυπροπυλένιο και το γυαλί, παρά το χαμηλό ποσοστό προσκόλλησης, υποστήριξαν τη βιωσιμότητα των προσκολληθέντων κυττάρων σε ποσοστό 100 %. Αυτή η εξαρτώμενη από την επιφάνεια επιβίωση μπορεί να κατέχει σημαντικό ρόλο στα σενάρια διασταυρούμενης επιμόλυνσης κατά τη μεταφορά βακτηρίων μεταξύ επιφάνειας και τροφίμων. Επιπλέον, η τραχεία επιφάνεια του ανοξείδωτου χάλυβα, εξαιτίας μικρο-ρωγμών και χαραμάδων, οδηγεί σε εγκλωβισμό των βακτηρίων κι έτσι συνεισφέρει στη μεταφορά τους στο περιβάλλον. Επίσης, η πορώδης υφή του ξύλου συνεισφέρει τόσο στον εγκλωβισμό των βακτηρίων όσο και στην δυσκολία καθαρισμού και απολύμανσής του.

Το στέλεχος του βακτηρίου

Τα βακτήρια αρχικά προσκολλώνται αντιστρεπτά σε αβιοτικές επιφάνειες. Καθώς τα βακτήρια είναι αρνητικά φορτισμένα, η προσκόλλησή τους αποτρέπεται λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Οι απωθητικές δυνάμεις, ωστόσο, υπερνικούνται και επιτυγχάνεται η μόνιμη προσκόλληση. Η διαδικασία συνήθως ολοκληρώνεται ύστερα από μερικές ώρες επαφής

(Chmielewski & Frank, 2003, Kumar & Anad, 1998, Poulsen, 1999, Simves, 2010, Van Houdt & Michiels, 2010). Κάποια εξαρτήματα του βακτηρίου γνωστά για τη συνεισφορά τους στην ανάπτυξη των βιοϋμενίων είναι τα μαστίγια, τα ινίδια, οι βλεφαρίδες και τα τριχίδια. Τα μαστίγια είναι ελικοειδείς δομές πρωτεϊνικής φύσης που εξέρχονται από το κυτταρόπλασμα διερχόμενα από το κυτταρικό τοίχωμα. Τα μαστίγια είναι υπεύθυνα για την κίνηση κι έτσι συνεισφέρουν στην ανάπτυξη και τη διασπορά των βιοϋμενίων στις επιφάνειες. Η αρχική προσκόλληση και η ωρίμανση του βιοϋμενίου της *L. monocytogenes*, *E. coli* και *Y. enterocolitica* φαίνεται να επηρεάζεται από την παρουσία αυτών των δομών (Simves et al., 2010, van Houdt & Michiels, 2010), ενώ η επίδρασή τους στο βιοϋμένιο της *Salmonella* είναι αντιφατική (Giaouris et al., 2012). Τα ινίδια είναι δομές της επιφάνειας των Gram αρνητικών βακτηρίων, πρωτεϊνικής φύσης, ευθείες στο σχήμα που δεν συνεισφέρουν στη κίνηση, αλλά εμπλέκονται στο σχηματισμό βιοϋμενίου της *E. coli* (συμπεριλαμβανομένων των στελεχών που παράγουν σίνγκα τοξίνες), των *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas caviae*, *Pseudomonas* spp., και *Vibrio* spp. (Simves et al., 2010, Van Houdt & Michiels, 2010). Οι κροσσοί είναι αμυλοειδούς φύσεως πρωτεΐνες επιφάνειας που μαζί με τη κυτταρίνη συνιστούν τα δυο κύρια συστατικά των βιοϋμενίων της *S. Typhimurium* και της *E. coli* (Bokranz et al., 2005, Giaouris et al., 2012, Römling et al., 1998). Τα τριχίδια είναι εξαρτήματα που εμπλέκονται στην οριζόντια μεταφορά γονιδίων, γνωστή και ως σύζευξη και διευκολύνουν την ανάπτυξη του βιοϋμενίου. Η εξωκυτταρική πολυμερής ουσία που παράγεται από τα βακτήρια συνεισφέρει στη σύζευξη των κυττάρων και άλλων υλικών μαζί και με την επιφάνεια (Van Houdt & Michiels, 2010). Προσκολλημένο στην επιφάνεια και παραγόμενο από τους μικροοργανισμούς αυτό το πολυανιονικό εξωκυτταρικό συστατικό συνίσταται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, τειχοϊκά και νουκλεϊκά οξέα και άλλα πολυμερή συστατικά και αποτελείται από νερό σε ποσοστό 85-95 % (Chmielewski & Frank, 2003).

Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία αποτελεί σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την προσκόλληση των κυττάρων σε αβιοτικές επιφάνειες, προσδιορίζει το οικολογικό τους υπόβαθρο, επηρεάζει τη φυσιολογία τους όσον αφορά την έκφραση γονιδίων και προκαλεί αλλαγή της επιφάνειας των κυττάρων. Συνήθως όμως η θερμοκρασία μελετάται σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, όπως το pH του θρεπτικού υλικού, την παρουσία επίστρωσης και οικολογικούς παράγοντες των στελεχών (Da SilvaMeira et al., 2014, Dourou et al., 2011, Nascentes et al., 2012, Norwood & Gilmour 2001, Speranza et al., 2011). Ο προσδιορισμός της προσκόλλησης της *L. monocytogenes* σε διαφορετικές

θερμοκρασίες (4, 20, 30, 37 °C) και θρεπτικό υλικό (BHI και ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα) έδειξε ότι η προσκόλληση των κυττάρων αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας με εξαίρεση τους 42 °C (Mai & Conner, 2007). Επίσης, στις θερμοκρασίες μεταξύ 20-42 °C, ο πληθυσμός των προσκολληθέντων κυττάρων ήταν υψηλότερος στο BHI. Τα θρεπτικά συστατικά και η θερμοκρασία φαίνεται να επηρεάζουν και το σχηματισμό του βιοϋμενίου. Εκατόν σαράντα τρία στελέχη της *L. monocytogenes* ελέγχθηκαν για το σχηματισμό βιοϋμενίου σε τέσσερις θερμοκρασίες (12, 20, 30, 37 °C) σε πλούσιο, μέτριο και πτωχό θρεπτικό υπόστρωμα (Kadam et al., 2013). Φάνηκε ότι ο σχηματισμός βιοϋμενίου μειώνεται με τη μείωση της θερμοκρασίας, η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος σχετίζεται άμεσα με τον ορότυπο (π.χ. ο σχηματισμός βιοϋμενίου των οροτύπων 1/2b και 1/2a ήταν αυξημένος σε σχέση με τον ορότυπο 4b σε πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα), αλλά η προέλευση των στελεχών (ζωικής, κρέατος, βιομηχανία γάλακτος ή ανθρώπινη) δεν επηρέασε το σχηματισμό βιοϋμενίου. Αντίθετα, η προέλευση του στελέχους φάνηκε να επηρεάζει το σχηματισμό βιοϋμενίου σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, σε μελέτη 95 στελεχών, σύμφωνα με την οποία τα κλινικά και τα περιβαλλοντικά στελέχη είχαν αυξημένη παραγωγή βιοϋμενίου σε υψηλότερες και χαμηλότερες θερμοκρασίες, αντίστοιχα (Nilsson et al., 2011). Ο σχηματισμός βιοϋμενίου αυξανόταν με την αύξηση της θερμοκρασίας και στις πιο όξινες (pH 4,7) ή αλκαλικές (pH 8,5) συνθήκες. Τριάντα στελέχη *Salmonella* μελετήθηκαν για το σχηματισμό βιοϋμενίου και τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στους 30 °C για 24 h και στους 22 °C για 48 h (Stepanovic et al., 2003). Στην ίδια μελέτη το μικρο-αερόφιλο και πλούσιο σε CO₂ περιβάλλον αποτέλεσε το καλύτερο περιβάλλον για το σχηματισμό βιοϋμενίου. Άλλη μελέτη έδειξε ότι η δι-επιφάνεια αέρα-υγρού αύξησε τον πληθυσμό του βιοϋμενίου (Giaouris & Nychas, 2006).

Προεμπλουτισμός επιφάνειας με θρεπτικές ουσίες (Conditioning film)

Οι περισσότερες επιφάνειες λαμβάνουν αρνητικό φορτίο όταν εμβαπτίζονται σε υγρό υπόστρωμα και έτσι συσσωρεύουν θρεπτικά συστατικά έλκοντας οργανικό υλικό και ιόντα σε αυτές, οδηγώντας σε επίστρωση θρεπτικών (Poulsen, 1999, Zottola & Sasahara, 1994). Αυτή η επίστρωση αλλάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες τις επιφάνειας, επηρεάζοντας την επακόλουθη προσκόλληση (Kumar & Anand, 1998). Επίσης, αναφέρεται ότι η προσκόλληση των κυττάρων είναι πιο άμεση όταν η επιφάνεια είναι επιστρωμένη με θρεπτικές ουσίες (Julien et al., 2008, Simves et al., 2010) και αυτό μπορεί να οφείλεται στη συσσώρευση θρεπτικών συστατικών σε σχέση με την υγρή φάση (Kumar & Anand, 1998). Η σημασία της επίστρωσης της επιφάνειας

(επιπροσθέτως της θερμοκρασίας) προσδιορίστηκε από μελέτη σύμφωνα με την οποία η *E. coli* O157:H7 εμφάνισε μεγαλύτερη προσκόλληση με φθίνουσα σειρά σε αλεσμένο βόειο κρέας (στερεό), λίπος άπαχου κρέατος (υγρό) και TSB και στις δύο θερμοκρασίες που μελετήθηκαν (4, 15 °C) (Dougou et al., 2011). Αντίθετα, μειωμένη προσκόλληση της *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε σε επιφάνειες επιστρωμένες με γιαούρτι, πιθανόν λόγω του χαμηλού pH (Poimenidou et al., 2009).

Μικτές καλλιέργειες

Σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, συνυπάρχουν διαφορετικά είδη μικροοργανισμών, έτσι ώστε οι χωρικές και μεταβολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών οδηγούν σε βιοϋμένια μικτών ειδών (Giaouris et al., 2012). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών έχουν σημαντική επίδραση στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την συμπεριφορά του κάθε στελέχους (James et al., 1995). Μια από τις πιο κοινές αλληλεπιδράσεις στα μικτά βιοϋμένια είναι ο ανταγωνισμός (Guillier et al., 2008, Leriche et al., 2000, Rao et al., 2005, Simoes et al., 2008, Tait et al., 2002). Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται για θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο και τον χώρο αποικισμού και παράλληλα αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων ειδών/στελεχών στο βιοϋμένιο. Προϊόντα μεταβολισμού που εκκρίνονται από κάποιο είδος μπορεί να προκαλέσουν τη θανάτωση ή την αναστολή ανάπτυξης άλλων ειδών. Επιπροσθέτως της προαναφερόμενης αρνητικής αλληλεπίδρασης, η σχέση συνεργασίας και προστασίας του ενός από το άλλο είδος επίσης μπορεί να παρατηρηθεί στα μικτά βιοϋμένια (Burmolle et al., 2006, Castonguay et al., 2006, Leriche et al., 2003, Reisner et al., 2006). Συσχετισμός κοινής ωφέλειας έχει επίσης παρατηρηθεί μεταξύ της *S. enterica* ser. Enteritidis και *Klebsiella pneumoniae* (Jones et al., 1997).

Σχηματισμός ώριμου βιοϋμενίου

Μόλις η προσκόλληση στην επιφάνεια επιτευχθεί, οι μικροοργανισμοί διατηρούν την επαφή με την επιφάνεια και αναπτύσσονται με σκοπό να σχηματίσουν ώριμο βιοϋμένιο. Οι πρώτοι αποικιστές διευκολύνουν την άφιξη και άλλων κυττάρων παρέχοντας περισσότερες και ποικίλες περιοχές προσκόλλησης και αρχίζοντας τη δημιουργία του σκελετού, που θα εξασφαλίσει τη συνοχή του βιοϋμενίου. Από τη στιγμή που θα αρχίσει η δημιουργία της αποικίας, το βιοϋμένιο αυξάνεται μέσω ενός συνδυασμού κυτταρικής διαίρεσης και συσσώρευσης μικροοργανισμών (Donlan, 2001).

Το επόμενο στάδιο σχηματισμού του βιοϋμενίου, η ωρίμανση, συμπεριλαμβάνει την παραγωγή πολύπλοκης και ετερογενούς (σε χώρο και χρόνο) μικροδομής (Costerton et al., 1994). Η χρήση σύγχρονων μικροσκοπικών μεθόδων, όπως η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης (confocal laser scanning microscopy) οδήγησε στη δυνατότητα λήψης εικόνων της δομής του βιοϋμενίου που υπάρχει στο φυσικό περιβάλλον. Αν και κάθε μικροβιακή κοινότητα παρουσιάζει μοναδική δομή, κάποια χαρακτηριστικά γνωρίσματα είναι κοινά (Costerton et al., 1995). Τα βιοϋμένια συμπεριλαμβάνουν μικρο-αποικίες κυττάρων που εσωκλείονται σε θεμέλια ουσία με τη μορφή “μανιταριού” ή “πύργων” και διαχωρίζονται από ενδιάμεσους κενούς χώρους (κανάλια ύδατος). Αυτά τα κανάλια ύδατος επιτρέπουν στο νερό και στις θρεπτικές ουσίες να διεισδύουν σε βαθύτερα στρώματα του ώριμου βιοϋμενίου.

Η ωρίμανση των βιοϋμενίων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών στο περιβάλλον, τη διάχυση των θρεπτικών ουσιών στο εσωτερικό του βιοϋμενίου και την απομάκρυνση των προϊόντων μεταβολισμού. Επιπλέον το pH, η θερμοκρασία, η διάχυση του O₂, η πηγή άνθρακα και η ωσμωτικότητα είναι σημαντικοί παράγοντες που ελέγχουν την ωρίμανση του βιοϋμενίου (Carpentier & Cerf, 1993, Corterson et al., 1995).

Διασπορά βιοϋμενίου

Ο σχηματισμός βιοϋμενίου είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για τα βακτήρια να παραμείνουν σε ένα προστατευμένο περιβάλλον έως ότου οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνουν ευνοϊκές. Όμως η μετάβαση των βακτηρίων από τα βιοϋμένια σε πλαγκτονικά και η μετανάστευση κυττάρων από τις κοινότητες βιοϋμενίων είναι απαραίτητη για τη δημιουργία νέων κοινοτήτων σε νέες τοποθεσίες. Επιπλέον, τα κύτταρα από κοινότητες βιοϋμενίων συχνά έρχονται αντιμέτωπα με μειωμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και συσσώρευση αποβλήτων λόγω μεταβολισμού, έτσι ώστε η τοπική αποικοδόμηση του βιοϋμενίου και η απελευθέρωση κυττάρων να είναι ευεργετική. Θεωρείται λοιπόν ότι τόσο η σύνθεση όσο και η αποικοδόμηση του βιοϋμενίου είναι σημαντικές διαδικασίες του κύκλου των βακτηρίων στο φυσικό περιβάλλον (Gjermansen et al., 2005).

Συνεπώς ο κύκλος της ζωής του βιοϋμενίου ολοκληρώνεται με τη διασπορά. Η διασπορά είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει την απελευθέρωση των βακτηρίων (ατομικά ή σε ομάδες) είτε με την απομάκρυνση των θυγατρικών κυττάρων, είτε με συνάθροιση κυττάρων λόγω υδροδυναμικών δυνάμεων είτε με αποκόλληση ως αποτέλεσμα της επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων ή λόγω έλλειψης θρεπτικών υλικών που αναγκάζουν τα βακτήρια να αναζητούν νέα περιβάλλοντα

(Donlan, 2002, Stoodley et al., 2002). Τα αποσπώμενα κύτταρα πιθανόν να διατηρούν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του βιοϋμενίου, ενώ κύτταρα που αποκολλώνται ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης είναι πιο πιθανό να ανακτούν άμεσα την πλαγκτονική μορφή ανάπτυξης (Donlan, 2002).

Συγκεκριμένα, το ώριμο βιοϋμένιο φαίνεται να απελευθερώνει κύτταρα ή ομάδες κυττάρων στο περιβάλλον μέσο και η αποκόλληση και η ακόλουθη επανα-προσκόλληση συμβαίνει σε διακριτή περίοδο χρόνου παρά σαν συνεχής διαδικασία (Kaplan & Fine, 2002). Η μικροσκοπική ανάλυση έδειξε ότι τα βακτήρια κινούνται στο υγρό υπόστρωμα σχεδόν αμέσως μετά τη διαδικασία αποικοδόμησης του βιοϋμενίου. Όμως το γεγονός ότι η διαδικασία αποικοδόμησης συμβαίνει και σε μη κινητά (λόγω μετάλλαξης) στελέχη οδηγεί στην υπόθεση ότι η διαδικασία δεν συμβαίνει λόγω της κινητικότητας καθ'εαυτής, αλλά λαμβάνει χώρα λόγω της δράσης συγκεκριμένων γονιδίων και των προϊόντων που παράγουν και τα οποία επηρεάζουν τη σύνδεση μεταξύ των κυττάρων που διατηρούν τα βακτήρια μαζί στα βιοϋμένια.

Βιοϋμένια σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων

Τις τελευταίες δεκαετίες, είναι ξεκάθαρο ότι τα βακτήρια συμπεριλαμβανομένου των τροφιμογενών παθογόνων όπως *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* και παθογόνων *E. coli* μαζί με αλλοιογόνα βακτήρια όπως *Pseudomonas* spp., *Brochotrix thermosfacta* και *Lactobacillus* spp. αναπτύσσονται κυρίως ως βιοϋμένια σε επιφάνειες παρά με τη πλαγκτονική τους μορφή (Lindsay & von Holy, 2006).

Τα βιοϋμένια που αναπτύσσονται από παθογόνα και αλλοιογόνα βακτήρια σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων αποτελούν πηγή επιμόλυνσης των τροφίμων, προκαλώντας υγειονομικά προβλήματα και οικονομικές απώλειες εξαιτίας της αλλοίωσης των τροφίμων (Jessen & Lammert, 2003, Sofos & Geornaras, 2010). Παρόλο που η αλλοίωση και η υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων μπορεί να προκαλέσει σημαντικές οικονομικές απώλειες, η ασφάλεια των τροφίμων είναι κύρια προτεραιότητα της παγκόσμιας αγοράς (Shi & Zhu, 2009).

Σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, οι κοινότητες βιοϋμενίων αποτελούνται από διάφορα είδη βακτηρίων που διαβιούν σε εγγύτητα (Carpentier & Chassaing, 2004, Habimana et al., 2010, Pan et al., 2009, Sanders et al., 2007). Χωρικές και μεταβολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών συνεισφέρουν στην οργάνωση των βιοϋμενίων που αποτελούνται από πολλαπλά είδη και συντελούν σε ένα δυναμικό τοπικό περιβάλλον (Moons et al., 2009, Nadell et al., 2009, Tolker-Neilsen & Molin, 2000). Τα βιοϋμένια που αποτελούνται από περισσότερα είδη είναι

συνήθως πιο σταθερά από τα αυτά που έχουν μόνο ένα είδος, ενώ οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων έχουν καίρια σημασία στο σχηματισμό του βιοϋμενίου, της δομής του και την αντίσταση των κυττάρων του βιοϋμενίου στα απολυμαντικά (Burmolle et al., 2006, Kostaki et al., 2012, Remis et al., 2010, Rieu et al., 2008, Uhllich et al., 2010, van der Veen & Abee, 2011).

Η ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται σε αβιοτικές επιφάνειες και να σχηματίζουν βιοϋμένια είναι σημείο ενδιαφέροντος για τις βιομηχανίες τροφίμων (Chmielewski & Frank, 2003). Σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, ο ανεπαρκής καθαρισμός των επιφανειών προάγει τη συσσώρευση υπολειμμάτων τροφίμων, τα οποία με τη παρουσία νερού συνεισφέρουν στην ανάπτυξη βιοϋμενίων. Οι επιφάνειες των περισσότερων βακτηρίων είναι αρνητικά φορτισμένες γεγονός που αποτρέπει την προσκόλληση στις επιφάνειες, εξαιτίας απωθητικής ηλεκτροστατικής δύναμης. Όμως η επιφάνεια των βακτηρίων έχει υδροφοβικότητα εξαιτίας των ινιδίων (fibrillae), του μαστίγιου (flagella) και των λιπο-πολυσακχαριτών (LPS) (Di Bonaventura et al., 2008, Takahashi et al., 2010). Οι υπερ-υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφάνειας του κυττάρου και του υποστρώματος διευκολύνουν το κύτταρο να υπερβεί τις απωθητικές δυνάμεις και να προσκολληθεί (Donlan, 2002). Οι ιδιότητες της επιφάνειας προσκόλλησης (π.χ. τραχύτητα, φυσικο-χημική σταθερότητα, αντίσταση στη διάβρωση) είναι επίσης παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και έτσι επηρεάζουν την υγιεινή κατάσταση του υλικού (Rodríguez et al., 2008, Tang et al., 2011). Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το pH, τα επίπεδα O₂, η θρεπτική σύσταση του υποστρώματος και η παρουσία άλλων βακτηρίων κατέχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία (Giaouris et al., 2005, Habimana et al., 2010, Hood & Zottola, 1997, Stepanovic et al., 2003). Το σύνολο των ανωτέρω παραγόντων προσδιορίζει την πρότυπη συμπεριφορά κάθε βακτηρίου σε σχέση με την ανάπτυξη του βιοϋμενίου (Goller & Romeo, 2008).

Το γεγονός ότι κύτταρα ή ομάδες κυττάρων μπορούν να αποκολληθούν από την επιφάνεια είναι ύψιστης σημασίας για τη βιομηχανία τροφίμων εξαιτίας του κινδύνου της επιμόλυνσης των τροφίμων. Η επικινδυνότητα είναι σημαντική εξαιτίας του γεγονότος ότι παθογόνοι μικροοργανισμοί σε βιοϋμένια μπορούν να εκφράζουν αυξημένη αντίσταση στα απολυμαντικά (Carpentier & Cerf, 1993, Costerton et al., 1999, Lewis, 2001). Η μεταφορά των παθογόνων προκαλείται επίσης από τα αερολύματα που παράγονται κατά το καθαρισμό των επιφανειών. Άλλες πηγές επιμόλυνσης στη βιομηχανία τροφίμων, όπου παρατηρείται σχηματισμός βιοϋμενίων, αποτελούν τα πατώματα, οι σωληνώσεις κ.τ.λ. (Kumar & Anand, 1998).

Τα βιοϋμένια, ωστόσο, δεν είναι πάντα βλαβερά, καθώς έχουν αναφερθεί ορισμένες περιπτώσεις όπου η προσκόλληση παθογόνων βακτηρίων αναστέλλεται λόγω του σχηματισμού βιοϋμενίου από τεχνολογικά βακτήρια όπως *Lactococcus lactis* και *Staphylococcus sciuri*

(Leriche et al., 1999, Leriche & Carpentier, 2000, Zhao et al., 2004). Ο σχηματισμός βιοϋμενίων από μη παθογόνα μικρόβια θα μπορούσε εναλλακτικά να χρησιμοποιηθεί ως καινοτόμο στρατηγική ενάντια στον αποικισμό, ανάπτυξη ή/και επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών στις επιφάνειες, σε συνδυασμό με προγράμματα καθαρισμού και απολύμανσης (Dourou, 2011).

Στρατηγικές ελέγχου των βιοϋμενίων

Μέχρι στιγμής διάφορες στρατηγικές έχουν προταθεί για τον έλεγχο του σχηματισμού των βιοϋμενίων και οι οποίες διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες. Η πρώτη αποσκοπεί στην πρόληψη της βακτηριακής προσκόλλησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου είτε μέσω της τροποποίησης των ιδιοτήτων της επιφάνειας ή μέσω αντιβακτηριδιακής επίστρωσης της επιφάνειας. Η δεύτερη αποσκοπεί στη διάσπαση/ καταπολέμηση των βιοϋμενίων με τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων, φυσικών δυνάμεων, ενζύμων, βακτηριοφάγων, κ.τ.λ.

Πρόληψη του σχηματισμού βιοϋμενίων

Ιδανικά, η πρόληψη σχηματισμού του βιοϋμενίου είναι πιο λογική στρατηγική από την καταπολέμησή του. Όμως μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια μέθοδος που να είναι ικανή να προλαμβάνει ή να ελέγχει τον σχηματισμό βιοϋμενίου χωρίς παρενέργειες. Η κύρια στρατηγική για την πρόληψη του σχηματισμού βιοϋμενίου είναι ο καθαρισμός και η απολύμανση πριν τα βακτήρια προσκολληθούν ισχυρά στις επιφάνειες (Simves et al., 2006). Άλλες στρατηγικές αποτελούν ο σχεδιασμός υλικών ή η τροποποίηση των φυσικών ιδιοτήτων τους ώστε να λειτουργούν αποτρεπτικά στη δημιουργία βιοϋμενίων. Η τροποποίηση αυτή μπορεί να γίνει με την έκθεση της επιφάνειας σε αντιβιοτικά με σταδιακή αποδέσμευση ή με ενσωμάτωσή τους στο υλικό ή ακόμα και με επίστρωσή τους στην επιφάνεια, επίστρωση της επιφάνειας του υλικού με μέταλλα (όπως Ag, Ti, Si), μετατροπές στην επιφάνεια του υλικού ώστε να αλλάξει η υδροφοβικότητα του και δημιουργία υλικών με κατά το δυνατόν «απόλυτα» λείες επιφάνειες (Κωνσταντινίδης & Φέσκου, 2011). Ο σχηματισμός υπερυδρόφοβης επιφάνειας έχει βρεθεί αποτελεσματικός στην πρόληψη της προσκόλλησης των κυττάρων και στο σχηματισμό βιοϋμενίου διαφόρων βακτηρίων όπως *P. aeruginosa* και *S. aureus* (Tang et al., 2011, Loo et al., 2012).

Προ-εμπλουτισμός των επιφανειών με επιφανειοδραστικές ουσίες έχει δυναμική δράση στην πρόληψη της βακτηριακής προσκόλλησης. Μη ιονικά και ανιονικά επιφανειοδραστικά έχουν

αποδειχθεί ότι προλαμβάνουν την προσκόλληση της *P. aeruginosa* σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα και γυαλιού (παρουσίασαν έως και 90 % αναστολή της προσκόλλησης) (Cloete & Jacobs, 2001). Οι Splendiani et al. (2006) μελέτησαν την επίδραση 22 επιφανειοδραστικών ουσιών στην αύξηση του φορτίου του κυτταρικού τοιχώματος των *Burkholderia* spp. και στη μείωση της δυνατότητας προσκόλλησης και σχηματισμού βιοϋμενίου. Κάποια επιφανειοδραστικά επηρέασαν επίσης το σχηματισμό μαστίγιου, υποδεικνύοντας σημαντικές αλλαγές στην προσκόλληση.

Επιπλέον, διάφορες τεχνολογίες έχουν μελετηθεί για την ακινητοποίηση ενεργών συστατικών όπως αντιμικροβιακά πεπτίδια, ουσίες anti-quorum sensing, αιθέρια έλαια, ένζυμα και τεταρτοταγές αμμώνιο, σε αβιοτικές επιφάνειες. Οι τροποποιημένες αυτές επιφάνειες οφείλουν τη δράση τους είτε στη θανάτωση των βακτηρίων είτε στην πρόληψη της προσκόλλησης. Όμως το γεγονός ότι κάποιες από αυτές τις αντιμικροβιακές επιστρώσεις μπορεί να είναι τοξικές για τον άνθρωπο περιορίζουν την εφαρμογή τους στον τομέα των τροφίμων και της ιατρικής (Abdalah et al., 2014).

Οι τροποποιημένες επιφάνειες μπορεί να μειώσουν αλλά όχι να αποτρέψουν την προσκόλληση των βακτηρίων. Επιπλέον, τα βακτήρια μπορούν να αναπτύξουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα απολυμαντικά σε ανταπόκριση στις τροποποιημένες επιφάνειες με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η διαχείριση της επικινδυνότητας.

Καταπολέμηση των βιοϋμενίων με απολυμαντικά

Στα νοσοκομεία και στις βιομηχανίες τροφίμων, χρησιμοποιούνται ευρέως βιοκτόνα για την απολύμανση επιφανειών, οργάνων και εξοπλισμού που έρχονται σε επαφή με το ανθρώπινο σώμα ή το τρόφιμο. Επιπλέον, υπάρχει μια ποικιλία εμπορικών απολυμαντικών που χρησιμοποιούνται σε αυτούς τους τομείς, όπως προϊόντα βασισμένα στην αλκοόλη, υποχλωρικά διαλύματα (hypochloric solutions) συμπεριλαμβανομένου του υποχλωριώδους νατρίου, αλδεύδες, υπεροξικό οξύ, υπεροξειδίο του υδρογόνου, όζον, διγλυκονική χλωρεξιδίνη, πολυεξαμεθυλενοδιγουανιδίνη (polyhexamethylene biguanides, PHMB) και τεταρτοταγείς βάσεις του αμμωνίου (Buckingham-Meyer et al., 2007, Belessi et al., 2011). Το ίδιο απολυμαντικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τομείς με κύρια διαφορά την συγκέντρωσή του. Τα βακτήρια διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους στα απολυμαντικά με τους σπόρους να είναι πιο ανθεκτικοί και κατά φθίνουσα σειρά τα μυκοβακτηρίδια, τα Gram αρνητικά και τα Gram θετικά βακτήρια (Maillard, 2005). Ωστόσο, δεν είναι πιθανόν να προβλεφθεί από τι μικροοργανισμούς έχει αποικηθεί μια επιφάνεια

και συνεπώς τα απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να στοχεύουν σε ένα εύρος παθογόνων μικροοργανισμών.

Ομάδες απολυμαντικών και μηχανισμός δράσης

Αντίθετα με τα αντιβιοτικά που επηρεάζουν μια συγκεκριμένη φυσιολογική διαδικασία του βακτηριακού κυττάρου, τα απολυμαντικά έχουν γενικά περισσότερους του ενός στόχους. Πιστεύεται ότι έχουν πολλαπλούς στόχους την κυτταροπλασματική μεμβράνη, τις πρωτεΐνες, το DNA, RNA και άλλα συστατικά του κυττάρου. Σε αυτή την ενότητα θα αναφερθούν οι ομάδες απολυμαντικών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διατριβή (επισημαίνονται με έντονη γραφή) και θα αναφερθεί ο μηχανισμός δράσης τους.

A) Χλώριο και παράγωγα χλωρίου

Το πιο αντιπροσωπευτικό ευρέως χρησιμοποιούμενο απολυμαντικό αυτής της ομάδας είναι το **υποχλωριώδες νάτριο**. Είναι ισχυρά οξειδωτικό και έχει ευρύ πεδίο δράσης συμπεριλαμβανομένου βακτηρίων, ιών και σποριών. Οι ενώσεις αυτές εξαιτίας της ισχυρής οξειδωτικής τους δράσης πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες, τα ένζυμα (ομάδες θειόλης θωρούνται ως στόχοι) και το DNA, προκαλώντας και λύση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Maillard, 2002, Dychdala, 2001). Το πλεονέκτημα τους είναι το χαμηλό κόστος και η αντοχή στο σκληρό νερό. Τα μειονεκτήματά τους αποτελούν ότι είναι διαβρωτικά, πτητικά και ερεθιστικά για τους βλεννογόνους.

B) Υπεροξείδια

Οι πιο σημαντικές ενώσεις αυτής της ομάδας είναι το **υπεροξικό οξύ** και το υπεροξείδιο του υδρογόνου που έχουν μικροβιοκτόνο, ιοκτόνο, σποροκτόνο και μυκοβακτηριοκτόνο δράση. Επιδρούν στο κύτταρο μέσω του σχηματισμού ριζών υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), που έχουν ισχυρά οξειδωτικές ιδιότητες και αλληλεπιδρούν με τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, τα νουκλεϊκά οξέα, τα ριβοσώματα, τα ένζυμα και τις πρωτεΐνες, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο

(McDonnell & Russell, 1999, Maillard, 2002; Block, 2001). Το πλεονέκτημα τους είναι ότι είναι βιοδιασπώμενο στο περιβάλλον. Τα μειονεκτήματα τους είναι ότι έχουν διαβρωτική δράση στα μέταλλα και είναι ασταθή μετά την διάλυση τους με νερό.

Γ) Παράγωγα τεταρτοταγούς αμμωνίου

Τα βιοκτόνα, όπως βάσεις του τεταρτοταγούς αμμωνίου, με κυριότερη ένωση το **χλωριούχο βενζαλκόνιο** συνδέονται αντιστρεπτά με τα φωσφολιπίδια και τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης επηρεάζοντας τη διαπερατότητα της (Maris, 1991). Έχουν δράση κυρίως έναντι των βακτηρίων, ωστόσο έχουν βρεθεί αποτελεσματικά κι έναντι των ιών με καγίδιο και των μυκήτων (McDonnell & Russell, 1999). Ο τρόπος δράσης αποτελείται από μια ακολουθία γεγονότων, όπου το απολυμαντικό απορροφάται και διαχέεται στο κυτταρικό τοίχωμα, οδηγώντας στην αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη και τη λύση της προκαλώντας διαρροή του κυτταρικού περιεχομένου, κατακρήμνιση και κυτταρικό θάνατο (Merianos, 2001).

Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του απολυμαντικού ενάντια στα βιοϋμένια

Η αντίσταση των βιοϋμενικών κυττάρων σε διάφορα βιοκτόνα, απολυμαντικά και αντιβιοτικά είναι περισσότερο αυξημένη συγκριτικά με τα πλαγκτονικά κύτταρα (Donlan & Costerton, 2002, Stewart & Costerson, 2001). Οι μηχανισμοί αντίστασης που αναπτύσσονται από τα βιοϋμενικά κύτταρα επιδεικνύουν ένα εύρος άμυνας που είναι αποτελεσματικό έναντι πολλών αντιμικροβιακών παραγόντων (Parsek & Singh, 2003). Όμως, όταν τα κύτταρα αποκολλώνται από τα βιοϋμένια αποκτούν μη ανθεκτικό φαινότυπο. Αυτό πιθανόν υποδεικνύει ότι η ανθεκτικότητά τους οφείλεται στη μορφή ανάπτυξης βιοϋμενίου και δεν είναι απαραίτητα αποτέλεσμα μεταλλάξεων ή απόκτησης γονιδίων αντίστασης.

Η ενεργότητα των βιοκτόνων έναντι στα βιοϋμένια εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες. Οι κύριοι φυσικοί και χημικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά τους είναι η συγκέντρωση, ο χρόνος έκθεσης, η θερμοκρασία και το pH (Belessi et al., 2011). Η αύξηση της θερμοκρασίας και του pH πιθανόν να αυξήσει την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών. Επιπροσθέτως, περιβαλλοντικοί παράγοντες κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του βιοϋμενίου μπορούν να επηρεάζουν την ανθεκτικότητα του βιοϋμενίου στα απολυμαντικά. Συγκεκριμένα, η

αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης και της παλαιότητας του βιοϋμενίου αυξάνει την αντίσταση στα απολυμαντικά. Ο τύπος της επιφάνειας επηρεάζει επίσης της αποτελεσματικότητα των βιοκτόνων στη θανάτωση και την απομάκρυνση των βιοϋμενίων από τις αβιοτικές επιφάνειες. Συγκεκριμένα, το είδος της επιφάνειας μπορεί σχετίζεται με την προστασία και τη δομή του βιοϋμενίου, αλλά και με την ευκολία στον καθαρισμό και την απολύμανση. Συχνά, η τραχύτητα της επιφάνειας κάνει την διαδικασία καθαρισμού πιο δύσκολη (Abdallah et al., 2014). Η ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων επηρεάζεται επίσης από το πάχος του βιοϋμενίου, την κυτταρική πυκνότητα, το είδος του βακτηρίου και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών σε περιπτώσεις μικτού βιοϋμενίου (Burmolle et al., 2006, Leriche et al., 2003).

Οι περισσότερες κλινικές οδηγίες για χρήση βιοκτόνων αφορούν πλαγκτονικά κύτταρα (Cerf et al., 2010). Ωστόσο, η πλειοψηφία των μικροοργανισμών επιβιώνει σε κοινότητες προσκολλημένες σε επιφάνειες. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί δείχνουν ότι τα βιοϋμενικά κύτταρα μπορεί να είναι μέχρι και 1000 φορές πιο ανθεκτικά από τα πλαγκτονικά στα απολυμαντικά (Belessi et al. 2011, Bridier et al., 2011a, Corterson et al., 1999). Έτσι, εμπορικά απολυμαντικά που έχουν επιβεβαιωμένη αποτελεσματικότητα στα πλαγκτονικά κύτταρα είναι συχνά μη αποτελεσματικά στην εκρίζωση των βιοϋμενίων. Διάφορες μελέτες έχουν προτείνει διάφορους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των βιοϋμενίων ως προς τα απολυμαντικά, όπως: (1) μειωμένη διείσδυση των βιοκτόνων στο βιοϋμένιο, (2) ο φαινότυπος των βιοϋμενικών κυττάρων (π.χ. μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης) και η προσαρμογή τους στο δυσμενές περιβάλλον (π.χ. οσμωτικό/οξειδωτικό stress), η παρουσία επιμένοντων κυττάρων και (4) η παρουσία προσαρμοσμένων κυττάρων στα απολυμαντικά (Abdallah et al., 2014, Lewis, 2001, Mah & O' Toole, 2001, Nikolaev & Plakunov, 2007, Stewart & Costerson, 2001).

Η μειωμένη διείσδυση των βιοκτόνων στο βιοϋμένιο

Ο σχηματισμός και η διατήρηση των ώριμων βιοϋμενίων σχετίζεται με την παραγωγή εξωκυτταρικής ουσίας. Οι πολλαπλές στιβάδες κυττάρων και η παρουσία εξωπολυσακχαριτών οδηγούν σε μια πολύπλοκη και συμπαγή δομή, όπου τα βιοκτόνα είναι δύσκολο να διεισδύσουν στις εσωτερικές στιβάδες κι έτσι μειώνεται η αποτελεσματικότητά τους. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από μελέτες που υποδεικνύουν ότι η εξωκυτταρική ουσία μπορεί να καθυστερήσει την εισχώρηση διάφορων απολυμαντικών στο βιοϋμένιο. Χρησιμοποιώντας συνεστιακό μικροσκόπιο παρατήρησης με τη πάροδο του χρόνου (time-lapse confocal laser imaging), οι Davison et al. (2010) βρήκαν ότι η διείσδυση της χλωρίνης και του τεταρτοταγούς αμμωνίου

(21-46 min) στο βιοϋμένιο καθυστέρησε σε σχέση με τη δράση της νισίνης (4 min). Χρησιμοποιώντας την ίδια τεχνική οι Bridier et al. (2011c) παρατήρησαν περιορισμό στη διάχυση του χλωριούχου βενζαλκόνιου που σχετιζόταν με την ανθεκτικότητα του βιοϋμενίου της *P. aeruginosa*.

Ωστόσο, επειδή τα βιοκτόνα είναι χημικώς ενεργά μόρια, η παρουσία οργανικής ουσίας όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και υδατανθράκων μπορεί να ελαττώσει σημαντικά την αποτελεσματικότητά τους και η αλληλοεπίδραση μεταξύ των αντιμικροβιακών και των συστατικών του βιοϋμενίου είναι πιο πιθανόν να εξηγήει τον περιορισμό της διείσδυσής τους σε αυτό (Bridier et al., 2011a).

Ο φαινότυπος των βιοϋμενικών κυττάρων

Ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης των βιοϋμενικών κυττάρων έχει προταθεί επίσης για την αντίσταση των βιοϋμενικών κυττάρων στα αντιμικροβιακά (Schulte et al., 2005). Έχει διαπιστωθεί ότι τα κύτταρα που βρίσκονται στην στατική φάση έχουν αυξημένη αντίσταση στα απολυμαντικά σε σχέση με αυτά που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης (Cherchi & Gu, 2011). Επιπλέον, φαίνεται ότι τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε βιοϋμένιο προσομοιάζουν με τα βακτήρια στη στατική φάση ανάπτυξης παρά με τα πλαγκτονικά κύτταρα. Έτσι, στις βαθύτερες στιβάδες του βιοϋμενίου η ανάπτυξη των βακτηρίων είναι μειωμένη λόγω της μειωμένης πρόσβασης σε θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο, γεγονός που αιτιολογεί τη μειωμένη πρόσληψη των αντιμικροβιακών.

Τα βιοϋμενικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από διαφορετικό φαινότυπο σε σχέση με τα πλαγκτονικά. Πιο αναλυτικά, η αυξημένη παραγωγή πολυσακχαριστών είναι φαινοτυπικό χαρακτηριστικό των κυττάρων προσκολλημένων σε επιφάνεια. Έτσι, η μετάβαση από τα πλαγκτονικά σε βιοϋμενικά κύτταρα συνδέεται με την αύξηση της έκφρασης γονιδίων βιοσύνθεσης της εξωκυτταρικής ουσίας. Η μετάβαση στο φαινότυπο βιοϋμενίου προκαλεί αλλαγές επίσης στο προφίλ των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης, που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ρευστότητας της μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι η ρευστότητα της μεμβράνης των *L. monocytogenes* (Gianotti et al., 2008) και *P. aeruginosa* μειώνεται κατά τη μετάβαση σε βιοϋμενικό στάδιο (Benamara et al., 2011). Αυτή η μείωση στη ρευστότητα της μεμβράνης μπορεί να παρεμποδίζει τη διείσδυση του βιοκτόνου στη διπλή στιβάδα λιπαρών οξέων και να αυξάνει την ανθεκτικότητα σε κυτταρικό επίπεδο. Επίσης, μεταβολές στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν κάποιες πρωτεΐνες παρατηρούνταν κατά τη μετάβαση στο φαινότυπο του βιοϋμενίου. Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης βιοϋμενίου της *S. Enteritidis* PT4 παρατηρήθηκε αλλαγή στην έκφραση 61 πρωτεϊνών (Giaouris et al., 2013). Επιπλέον, η

συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι τα βιοϋμενικά κύτταρα διαφέρουν από τα πλαγκτονικά στην έκφραση μιας ομάδας γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ανταπόκριση στο stress, με τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και με το μεταβολισμό του κυττάρου (Giaouris et al., 2013). Έτσι, οι αλλαγές στη σύνθεση των πρωτεϊνών μπορεί να σχετίζονται με την αντίσταση στα απολυμαντικά (Tabata et al., 2003).

Τα βιοϋμενικά κύτταρα εκτίθενται σε διάφορα στρες όπως έλλειψη θρεπτικών συστατικών, οσμωτικό ή οξειδωτικό στρες. Στις συνθήκες αυτές, τα κύτταρα αυτά ανταποκρίνονται με την έκφραση του παράγοντα σίγμα στρες «stress sigma factor RpoS (σS)». Αυτός ο παράγοντας έχει βρεθεί ότι ασκεί θετική ρύθμιση (upregulates) σε συγκεκριμένα γονίδια Gram αρνητικών βακτηρίων όπως τα *P. aeruginosa* και *E. coli*. Αυτός ο παράγοντας επάγει τη ρύθμιση 240 γονιδίων που οδηγούν στην παραγωγή πρωτεϊνών ρύθμισης του στρες, μεταβολικών ενζύμων, κυτταρικών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Η έκφραση του εναλλακτικού παράγοντα σίγμα B «alternative sigma factor SigB (σB)», που ελέγχει τις κυτταρικές αποκρίσεις στο κυτταρικό στρες στα Gram θετικά βακτήρια έχει επίσης βρεθεί να επάγεται υπό συνθήκες βιοϋμενίου. Έτσι, αυτοί οι παράγοντες πιθανόν να έχουν κάποια επίδραση επηρεάζοντας και την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την αντίσταση στα βιοκτόνα (Abdallah et al., 2014). Επιπλέον, η κατάργηση του γονιδίου του παράγοντα σίγμα έχει βρεθεί να αυξάνει την ευαισθησία τόσο των πλαγκτονικών όσο και των βιοϋμενικών κυττάρων της *L. monocytogenes* στο χλωριούχο βενζαλκόνιο και το υπεροξικό οξύ, στα βιοϋμενικά κύτταρα της *P. aeruginosa* στο υπεροξειδίο του υδρογόνου και στα βιοϋμενικά κύτταρα του *S. aureus* σε διάφορα οικιακά καθαριστικά. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα των βιοϋμενίων σε ανταπόκριση στο οξειδωτικό στρες μπορεί επίσης να αυξήσει την ανθεκτικότητα των βιοϋμενικών κυττάρων σε όξινα απολυμαντικά όπως το υποχλωριώδες νάτριο και το υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Η παρουσία προσαρμοσμένων στα απολυμαντικά και επιμενότων κυττάρων

Η αυξημένη χρήση απολυμαντικών σε χαμηλές συγκεντρώσεις που συνιστάται από τους κατασκευαστές έχει αυξήσει τις ανησυχίες για την αποτελεσματικότητά τους, καθώς έχει αναφερθεί εμφάνιση ανθεκτικότητας σε απολυμαντικά σε συγκεκριμένα βακτήρια. Επιπλέον, χώροι επεξεργασίας τροφίμων και υγειονομικής περίθαλψης συνιστούν δεξαμενές βακτηρίων που παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα σε προϊόντα απολύμανσης λόγω λανθασμένης χρήσης τους. Επιπλέον, τα βακτήρια που είναι προσαρμοσμένα σε κάποιο απολυμαντικό μπορεί να εμφανίσουν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα και σε άλλα. Έτσι, ο ιατρικός εξοπλισμός και οι επιφάνειες

επεξεργασίας τροφίμων αντιμετωπίζουν άμεσα το πρόβλημα του σχηματισμού βιοϋμενίου στο οποίο εμπεριέχονται ανθεκτικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα να επιβιώσουν μετά την απολύμανση. Επιπλέον, η έκθεση των βακτηρίων σε υπο-θανάτιες συγκεντρώσεις απολυμαντικών δημιουργεί αλλαγές στο φαινότυπο εξαιτίας της δραστηριότητας εξειδικευμένων αντλιών ενεργητικής εξώθησης (efflux pump activity) (Mc Cay et al., 2010). Οι πρωτεΐνες ενεργητικής εξώθησης, γνωστές και ως multidrug resistance (MDR), απομακρύνουν τα τοξικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων και των αντιμικροβιακών παραγόντων από το κύτταρο. Ωστόσο, η εμπλοκή αυτών των δομών στην ανθεκτικότητα του βιοϋμενίου δεν είναι απολύτως κατανοητή, καθώς η έκφρασή τους δεν αυξάνεται στο βιοϋμένιο (Folsom et al., 2010).

Πρόσφατα, η εμπλοκή των επιμενόντων κυττάρων στα βιοϋμένια έχει προταθεί ως υπόθεση για την ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων στα απολυμαντικά. Τα επιμένοντα κύτταρα είναι ένας φαινότυπος που είναι εξαιρετικά ανθεκτικός στα αντιμικροβιακά (Simves et al., 2011). Αυτός ο πληθυσμός έχει υπολογιστεί ότι ανέρχεται 0.1–10 % του συνολικού πληθυσμού του βιοϋμενίου.

Τα επιμένοντα κύτταρα και τα βιοϋμένια που τα συμπεριλαμβάνουν επιδεικνύουν ανοχή που σημαίνει ότι τα κύτταρα δεν πολλαπλασιάζονται παρουσία αντιβιοτικών αλλά και ούτε θανατώνονται (Keren et al., 2004). Η ικανότητα να αποφεύγουν τη θανάτωση είναι το χαρακτηριστικό των επιμενόντων κυττάρων. Τα βιοϋμένια όμως δεν είναι τα μοναδικά που έχουν πληθυσμούς επιμενόντων κυττάρων. Η στατική φάση της καλλιέργειας των βακτηρίων αποτελείται επίσης από μεγάλους πληθυσμούς επιμενόντων κυττάρων και εμφανίζουν ανοχή παρόμοια με των βιοϋμενίων. Τα επιμένοντα κύτταρα είναι εξειδικευμένα κύτταρα με αυξημένη ικανότητα επιβίωσης, η παραγωγή των οποίων εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης. Είναι κύτταρα σε κατάσταση βαθιάς αδράνειας (deep dormancy). Τα επιμένοντα κύτταρα, ωστόσο, δεν σχηματίζονται λόγω ανταπόκρισης στα αντιβιοτικά, καθώς κύτταρα σε πρόωμη εκθετική φάση ανάπτυξης που εκτέθηκαν σε αντιβιοτικά δεν παράγαν τέτοιους πληθυσμούς (Nystrom, 2003).

Προστασία των παθογόνων σε μικτά βιοϋμένια

Σε φυσικό περιβάλλον είναι ξεκάθαρο ότι τα βιοϋμένια είναι πολύπλοκες δομές από διαφορετικά είδη κι όχι από μονοκαλλιέργειες όπως συνήθως μελετώνται σε εργαστηριακό επίπεδο (Simves et al., 2008, Zijng et al., 2010). Σε αυτές τις πολύπλοκες κοινότητες μικροοργανισμών οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση συγκεκριμένων φαινοτύπων.

Όντως, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα μικτά βιοϋμένια είναι γενικά πιο ανθεκτικά στην απολύμανση από τις μονοκαλλιέργειες (Luppens et al., 2008, Simoes et al., 2009, 2010, Van der Veen & Abee, 2011). Δυστυχώς οι μηχανισμοί που αιτιολογούν αυτή τη πρόταση δεν έχουν διευκρινιστεί. Η φύση και η σύσταση της εξωκυτταρικής ουσίας των μικτών βιοϋμενίων έχει προταθεί ως ένας υπεύθυνος παράγοντας. Επίσης, η χημική αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυμερών που παράγονται από κάθε είδος οδηγεί στη δημιουργία εξωκυτταρικής ουσίας με μεγαλύτερο ιξώδες, που πιθανόν να μειώνει τη διείσδυση των αντιβιοτικών. Άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι εξαιτίας της χωροταξικής διάταξης των ειδών στο βιοϋμένιο, κάποια στελέχη προστατεύονται από το βιοκτόνο λόγω της συνάθροισής τους με άλλα (Bridier et al., 2011a).

Σκοπός της διατριβής

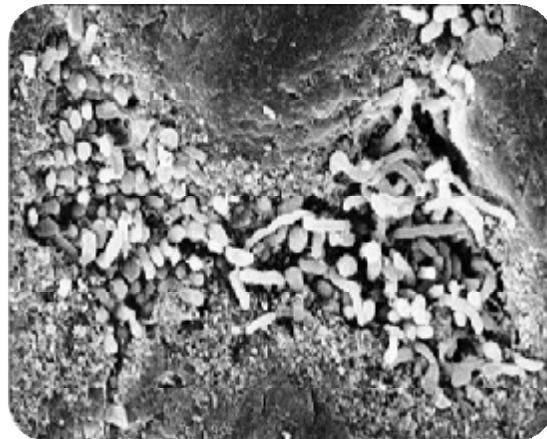
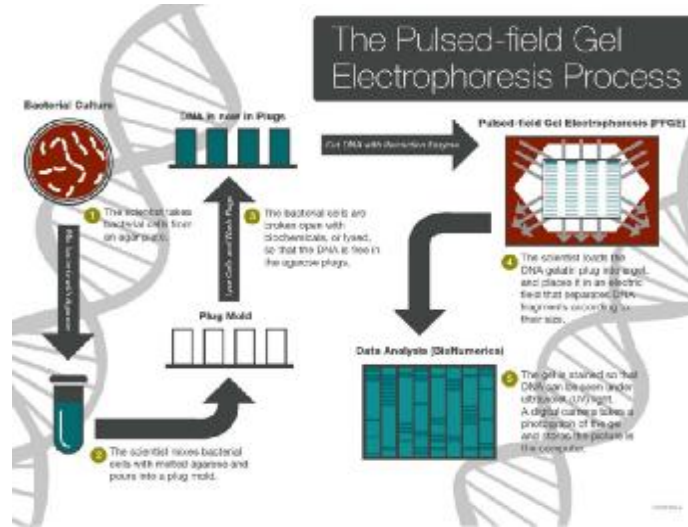
Όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση οι τροφιμογενείς λοιμώξεις αποτελούν σημαντικές αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Σημαντικό ποσοστό των τροφολοιμώξεων έχει ως πηγή το οικιακό περιβάλλον, καθώς η έλλειψη γνώσης των αρχών της ασφάλειας τροφίμων κι οι λανθασμένες πρακτικές στην καθημερινή προετοιμασία των τροφίμων από τους καταναλωτές οδηγούν συχνά σε φαινόμενα διασταυρούμενης επιμόλυνσης.

Η διασταυρούμενη επιμόλυνση, σε συνδυασμό με ελλειπείς συνθήκες καθαρισμού/ απολύμανσης των επιφανειών, οδηγούν στην προσκόλληση τροφιμογενών παθογόνων στις επιφάνειες και στο σχηματισμό βιοϋμενίων, που με τη σειρά τους αποτελούν πηγή επαναμόλυνσης των τροφίμων. Συνεπώς, ο σκοπός αυτής της διατριβής ήταν αρχικά η διερεύνηση των γνώσεων και των αυτοαναφερόμενων πρακτικών των καταναλωτών στην Ελλάδα, σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων, ώστε να εντοπιστούν ενδεχόμενοι λανθασμένοι χειρισμοί που πιθανόν να είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση τροφιμογενών λοιμώξεων σε οικιακό περιβάλλον και να διερευνηθεί η συσχέτιση τους με δημογραφικά στοιχεία. Εν συνεχεία, εξετάστηκε η ποσοτικοποίηση φαινομένων διασταυρούμενης επιμόλυνσης τροφιμογενών παθογόνων μεταξύ τροφίμων και επιφανειών επεξεργασίας τροφίμων, με σκοπό τη διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν το επίπεδο μεταφοράς τους σε οικιακό περιβάλλον, στα πλαίσια αξιολόγησης της μικροβιολογικής εκτίμησης κινδύνου. Επίσης, μελετήθηκε ο σχηματισμός βιοϋμενίων σε επιφάνειες ως δεξαμενή τροφιμογενών παθογόνων και διερευνήθηκαν τρόποι πρόληψης και αντιμετώπισής τους.

Συγκεκριμένα, στο ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 αποτυπώνεται τόσο η γνώμη/γνώση των Ελλήνων καταναλωτών σε θέματα ασφαλείας χειρισμού, όσο και οι κατά δήλωση πρακτικές χειρισμού τροφίμων σε

οικιακό επίπεδο, με τη χρήση ερωτηματολογίου. Επιπλέον, καταγράφεται το ποσοστό των τροφολοιμώξεων στο δείγμα τους τελευταίους 12 μήνες και η πιθανή πηγή επιμόλυνσης. Στο ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3, μέσω της ποσοτικοποίησης της μεταφοράς τροφιμογενών παθογόνων (*S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7) από βόεια φιλέτα σε διαδοχικά μη επιμολυσμένα φιλέτα, διερευνήθηκε η επίδραση του τύπου της επιφάνειας, του αρχικού επιπέδου ενοφθαλμισμού, του είδους των βακτηρίων και του χρόνου επαφής. Το ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 περιγράφει την μεταφορά της *S. Typhimurium* από βόεια φιλέτα σε ντομάτες μέσω επαφής και τεμαχισμού σε επιφάνειες επεξεργασίας. Επίσης, μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα κοινών τρόπων καθαρισμού και απολύμανσης που εφαρμόζονται σε οικιακό επίπεδο. Στο ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 μελετήθηκε η επίδραση κοινών απολυμαντικών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων σε μονά ή μικτά βιοϋμένια *S. Typhimurium* και *S. aureus* και η ενδεχόμενη ανθεκτικότητα στις μικτές καλλιέργειες των στελεχών. Επιπροσθέτως, έγινε έλεγχος της επικράτησης των στελεχών με την μέθοδο της PFGE. Στο ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 μελετήθηκε η χρήση υπερ-υδρόφοβων νανοεπιστρώσεων σε επιφάνειες ως προς την ικανότητά τους να προλαμβάνουν την προσκόλληση ή να μειώνουν τον πληθυσμό του βιοϋμένου παθογόνων (*S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *S. aureus*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2



Υλικά και μέθοδοι

Παθογόνοι μικροοργανισμοί της παρούσας μελέτης

Όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη αποθηκεύονταν στους -80 °C σε φιαλίδια με κρυοπροστατευτικά σφαιρίδια (Microbank™ porous beads, Pro-Lab Diagnostics, Austin, TX, United States) που περιέχουν θρεπτικό ζωμό Tryptic Soy Broth (TSB, LAB M) και 20 % γλυκερόλη για την προστασία των κυττάρων (Πίνακας 4). Η ενεργοποίηση των καλλιιεργειών γίνονταν με προσθήκη των beads σε 10 ml TSB κι επώαση σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για κάθε στέλεχος (30 °C για *L. monocytogenes*, 37 °C για *S. Typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*) για 24 h. Έπειτα, 10 μl από την καλλιέργεια μεταφερόταν σε 10 ml TSB και επωαζόταν στις προαναφερόμενες θερμοκρασίες για 18 h. Η φυγοκέντρηση των καλλιιεργειών έγινε σε 5000 × g στους 4 °C για 10 min (Multifuge 1S-R, Thermo Electron Corporation). Στη συνέχεια γίνονταν έκπλυση του ίζηματος των κυττάρων εις διπλούν σε 10 ml διαλύματος 1/4 Ringer (LabM, 100Z), πριν τον ενοφθαλμισμό.

Πίνακας 4. Στελέχη τροφιμογενών παθογόνων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη και η προέλευσή τους

Είδος	Στέλεχος	Χαρακτηριστικά στελέχους	Προέλευση
<i>Listeria monocytogenes</i>	FMCC B-125 ScottA	Ορότυπος 4b	Απομόνωση από άνθρωπο ^b
	FMCC 21350 B-129	Ορότυπος 4b	Κατεψυγμένο τρόφιμο (με βάση τον κιμά)
	FMCC B-169		Εργοστάσιο τροφίμων/ Μεταφορική ταινία
	NCTC 10527	Ορότυπος 4b	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό παιδιού μηνιγγίτιδα, Γερμανία ^a
	FMCC B-126		Απομόνωση από κρέας ^c
	FMCC 21085		Απομόνωση από μαλακό τυρί ^c
<i>Salmonella enterica ser. Typhimurium</i>	FMCC B-137 DT 193	Αντιβιοανθεκτικό	Απομόνωση από άνθρωπο, επιδημία ^d
	FMCC B-193 4/74		Απομόνωση από έντερο μόσχου ^d

	FMCC B-194 JH3298		Μετάλλαξη σε <i>rpsm:gfp</i> από <i>S. Typhimurium</i> 4/74 ^d
	FMCC B-410 ATCC 14028		Ιστό ζώου
<i>E. coli</i> O157:H7	FMCC B-15 NCTC 13125	Αρνητικό σε σιγκατοξίνες	Κοπρανολογική εξέταση ανθρώπου ^a
	FMCC B-16 NCTC 12079	Παράγει σιγκατοξίνες V1 - V2	Κοπρανολογική εξέταση ανθρώπου ^a
	FMCC B-18 NCTC 13127	Αρνητικό σε σιγκατοξίνες	Κοπρανολογική εξέταση ανθρώπου ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	FMCC B-415	MRSA στέλεχος COL	Νοσοκομείο (Μ. Βρετανία)
	FMCC B-134 ATCC 6538		Δερματική αλλοίωση
	FMCC B-135 NCBF 1499		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	FMCC B-89	CITY650	
	FMCC B-90	CITY844	

^a Dr. E. Drosinos

^b Dr. E. Smid, ATO-DLO Netherlands

^c Food Microbiology Culture Collection of Agricultural University of Athens

^d Dr. P. Skandamis

Θρεπτικά υποστρώματα και συνθήκες επώασης

Χρησιμοποιήθηκαν Palcam Listeria Agar Base (Biolife, 4016042) για *L. monocytogenes*, Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD, Biolife) για *S. Typhimurium*, Harlequin Tryptone Bile Glycorunide Agar (LabM, HAL 003) για *E. coli* και Baird-Parker Agar με Egg Yolk Tellurite Emulsion (Biolife) για τον *S. aureus*. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επώαστηκαν αερόβια ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού και συγκεκριμένα στους 30 °C για 48 h (*L. monocytogenes*), στους 37 °C για 24 h (*S. Typhimurium*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*), στους 37 °C για 4 h κι έπειτα στους 44 °C για 18-20 h (*E. coli* O157:H7).

Μεθοδολογία έρευνας

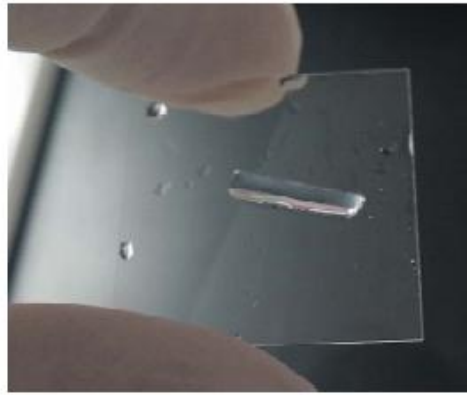
Ηλεκτροφόρηση Εναλλασσόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)

Με σκοπό να προσδιοριστεί η συνεισφορά του κάθε στελέχους *S. Typhimurium*, 10 % των αποικιών (6 με 24 αποικίες) που αναπτύχθηκαν σε XLD επιλέχθηκαν και αφού ελέγχθηκαν για την καθαρότητά τους αποθηκεύτηκαν στους -80 °C σε TSB που περιείχε 25 % (vol/vol) γλυκερόλη. Η τεχνική PFGE εφαρμόστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Doulgeraki et al. (2011). Συνοπτικά, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν εις διπλούν στις 10.000 X g για 5 min και πλύθηκαν με διάλυμα 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) που περιείχε 1 M NaCl. Τα βακτηριακά κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100 μl του ίδιου διαλύματος και αναμείχθηκαν με 100 μl μείγματος 2 % (w/v) αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως σε 0,125 M EDTA, pH 7,6. Το μείγμα αυτό στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε θήκες με σκοπό τον σχηματισμό πλάκας (plug) αγαρόζης και αφέθηκε προς πήξη στους 4 °C για 2h (**Εικόνα 4**).



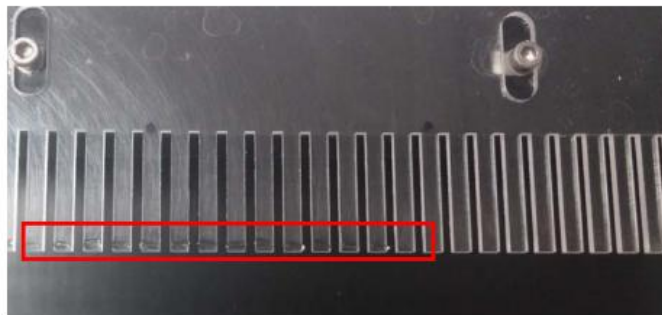
Εικόνα 4. Θήκες plugs τοποθετημένες σε γυάλινη επιφάνεια (αναπαραγωγή μετά από άδεια από Βαβούλα, 2015)

Ακολούθησε εφαρμογή διαλύματος λυσοζύμης (10 mg/ml) σε διάλυμα EC (1 M NaCl, 6 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% (w/v) Sarkosyl pH 7,6) και επώασης για 16 h στους 37 °C, πρωτεϊνάσης K (0,5 mg/ml) σε διάλυμα 0,5 M EDTA, 1 % sarkosyl (pH 8) και επώασης για 24 h στους 55 °C. Οι πλάκες αγαρόζης τοποθετήθηκαν σε διάλυμα TE 10/1 (1,21g Tris, 0,372g EDTA, pH 8) με θιουρία (50 μM) και αφέθηκαν για ανάδευση για 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν ξεπλύματα με TE 10/1 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 min. Στη συνέχεια οι πλάκες αγαρόζης τοποθετήθηκαν σε διάλυμα PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) (1 mM) για 1 h στους 37 °C εις διπλούν. Έπειτα οι πλάκες αγαρόζης τεμαχίστηκαν με καλυπτρίδες σε λωρίδες μεγέθους 1-2 mm και εφαρμόστηκε διάλυμα με περιοριστικό ένζυμο 10 IU XbaI στους 37 °C για 16 h (**Εικόνα 5**).



Εικόνα 5. Τεμαχισμένη πλάκα αгарόζης (1-2 mm) τοποθετημένη σε καλυπτρίδα (Βαβούλα, 2015)

Εν συνεχεία οι πλάκες αгарόζης τεμαχίστηκαν στο $\frac{1}{5}$ του μήκους τους και τοποθετήθηκαν στην ειδική χτένα της φόρμας της πηκτής (**Εικόνα 6**, **Εικόνα 7**). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1 % σε 0,5 X TBE με προσθήκη 100 μ M θιουρίας.



Εικόνα 6. Τεμαχισμένες στο 1/5 plugs τοποθετημένες πάνω στην ειδική χτένα της φόρμας του gel (Βαβούλα, 2015)

Ρυθμίστηκε το κατάλληλο πρόγραμμα ως εξής: 6 V/cm, 3,2 sec αρχικός χρόνος, 62,4 sec τελικός χρόνος, συνολικός χρόνος 20 h στους 14 °C.



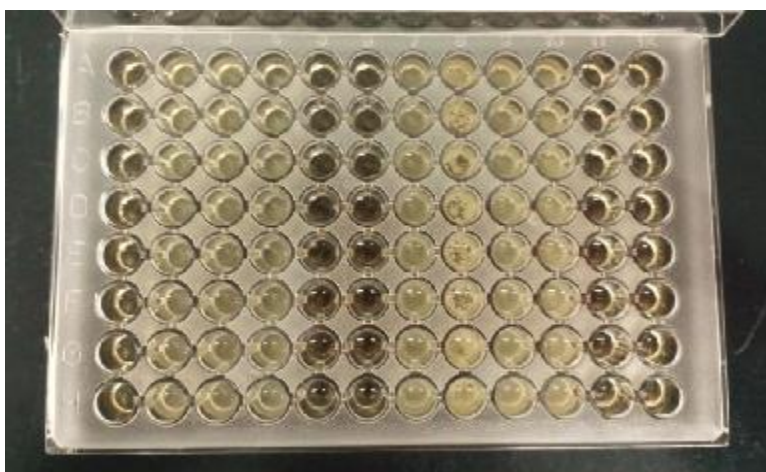
Εικόνα 7. Τεμαχισμένες μάντες που ήταν τοποθετημένες στην ειδική ‘χτένα’ της φόρμας της πήκτης και εμβαπτίστηκαν στην πηκτή της αгарόζης (Βαβούλα, 2015)

Έγινε χρώση των gel με βρωμιούχο αιθίδιο (50 $\mu\text{g/L}$) για 1 h και σε νερό για 2 h, πριν τη λήψη φωτογραφιών. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Quantity One 4.6.3. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τον *S. aureus* είναι όμοιο σε τη *S. Typhimurium* εκτός συγκεκριμένων παραλλαγών. Η λυσοζύμη προστέθηκε σε λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα εις διπλούν *in situ* και επώαστηκε για 16 και 24 h στους 37 °C. Ως περιοριστικό ένζυμο χρησιμοποιήθηκε το 10 IU SmaI και επώαστηκε στους 25 °C για 16-18 h. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το *S. aureus* ήταν 6 V/cm, 5 sec αρχικός χρόνος, 40 sec τελικός χρόνος, συνολικός χρόνος 21 h στους 14 °C.

Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε βοθρία πολυστυρενίου

Σχηματισμός βιοϋμενίου

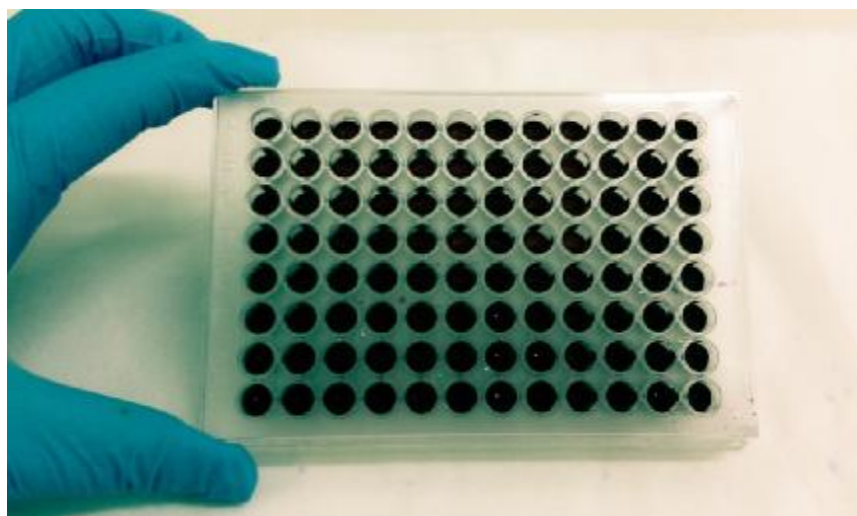
Στις καλλιέργειες του εκάστου στελέχους έγιναν δύο διαδοχικές αραιώσεις από τις αρχικές καλλιέργειες ($\sim 10^8$ κύτταρα ανά ml) και 20 μl εγχύθηκαν σε μικροπλακίδια 96 βοθρίων που περιείχαν 180 μl TSB (**Εικόνα 8**). Η επώαση για την ανάπτυξη του βιοϋμενίου έγινε στους 37 °C χωρίς ανάδευση κι η ποσοτικοποίηση μέσω της μέτρησης της οπτικής απορρόφησης, στις 24 και 48 h.



Εικόνα 8. Ανάπτυξη βιοϋμενίου μικροοργανισμών σε βοθρία πολυστυρενίου σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptic Soya Broth

Χρώση βιοϋμενίου με κρυσταλλικό ιώδες (Crystal Violet) και ποσοτικοποίηση βιοϋμενίου με μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Μετά την επώαση τα πλαγκτονικά κύτταρα αφαιρέθηκαν με βίαιο αναποδογύρισμα του μικροπλακιδίου και τα βοθρία ξεπλύθηκαν εις διπλούν με 200 μl διαλύματος Ό Ringer για την απομάκρυνση των ελαφρώς προσκολλημένων κυττάρων. Τα εναπομείναντα προσκολλημένα κύτταρα που συνιστούν το σχηματισμένο βιοϋμένιο σταθεροποιήθηκαν με μεθανόλη για 15 min και μετά το μικροπλακίδιο αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 20 min.



Εικόνα 9. Χρώση βιοϋμενικών κυττάρων με 1 % διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους σε βοθρία πολυστυρενίου

Έγινε χρώση των βιοϋμενικών κυττάρων με 100 μ l 1 % διαλύματος κρυσταλλικού ιώδους το οποίο προστέθηκε σε κάθε βοθρίο (**Εικόνα 9**). Μετά το πλύσιμο εις τριπλούν με 200 μ l απιονισμένου νερού για την απομάκρυνση της περίσσειας χρώσης, το κρυσταλλικό ιώδες που παρέμεινε στο πυθμένα των βοθρίων (λόγω των προσκολλημένων κυττάρων) διαλυτοποιήθηκε σε 100 μ l 95 % αιθανόλη για 15 min (**Εικόνα 10**). Η απορρόφηση της χρώσης στα 575 nm (A_{575}) μετρήθηκε σε καταγραφικό μηχάνημα μικροπλακιδίων (Sunrise, Tecan, Mönndorf, Switzerland).



Εικόνα 10. Επαναδιαλυτοποίηση του κρυσταλλικού ιώδους που απορροφήθηκε από τα βιοϋμενικά κύτταρα με 95 % αιθανόλη.

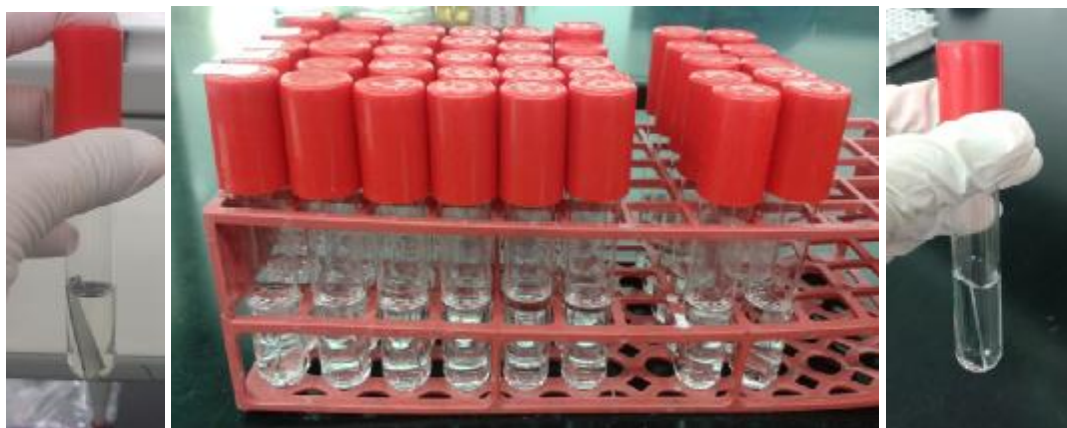
Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα και γυάλινες

Καθαρισμός επιφανειών

Επιφάνειες («κουπόνια») ανοξειδωτου χάλυβα ($3 \times 1 \times 0,1$ cm, τύπου AISI-304, Χαλυβουργική) και γυάλινες επιφάνειες ($3 \times 1 \times 0,1$ cm υλικού πλακιδίων μικροσκοπίου) εμβαπτίστηκαν σε ακετόνη για να απομακρυνθούν υπολείμματα και λίπη. Τα κουπόνια έπειτα πλύθηκαν για 30 min στους $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε 2 % (vol/vol) διάλυμα του εμπορικού απορρυπαντικού RBS 35 (Fluka/Life Science Chemilab, S.A.) με ανάδευση. Εν συνεχεία ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης και απιονισμένο και τέλος αφέθηκαν να στεγνώσουν. Τέλος, τα καθαρισμένα κουπόνια τοποθετήθηκαν ατομικά σε άδειους δοκιμαστικούς (ύψος 10 cm, διάμετρος 1,5 cm) και αποστειρώθηκαν στους $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 15 min.

Σχηματισμός βιοϋμενίου

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Kostaki et al., 2012), οι καλλιέργειες μετά από επώαση 24 h και 18 h στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε TSB, φυγοκεντρήθηκαν εις διπλούν στα $5.000 \times g$ για 10 min. Στις καλλιέργειες ακολουθούσε αραιώση 1:100 και 0,5 ml προστίθονταν σε 4,5 ml Ringer που περιείχε γυάλινο ή μεταλλικό κουπόνι. Για το στάδιο της προσκόλλησης το κουπόνι επωάζονταν στους $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 3 h υπό στατικές συνθήκες (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11. Στάδιο προσκόλλησης βακτηρίων σε γυάλινες επιφάνειες σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ¼ Ringer

Ακολουθώντας το στάδιο της προσκόλλησης, κάθε κουπόνι αφαιρέθηκε από το δοκιμαστικό σωλήνα με αποστειρωμένη λαβίδα και έγινε πλύση με 10 ml 1/4 Ringer εις διπλούν από κάθε πλευρά. Εν συνεχεία το κουπόνι τοποθετήθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 5 ml

TSB και επώσθηκε για συγκεκριμένες ώρες, σε συγκεκριμένη θερμοκρασία ανάλογα με τη πειραματική διαδικασία (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6, 7), υπό στατικές συνθήκες (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Τοποθέτηση κουπονιού ανοξειδωτού χάλυβα σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soya Broth για την ανάπτυξη του βιοϋμενίου

Ποσοτικοποίηση βιοϋμενίου

Για την απομάκρυνση των κυττάρων από τις επιφάνειες χρησιμοποιήθηκε η «μέθοδος του στροβιλισμού με σφαιρίδια» (“bead vortexing method”). Μετά την επώαση οι μεταλλικές επιφάνειες εξήχθησαν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες και εκπλύθηκαν δύο φορές με 10 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer για την απομάκρυνση των ασθενώς προσκολλημένων κυττάρων. Έπειτα τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 6 ml Ringer και από 10 μεταλλικά σφαιρίδια διαμέτρου 1,5 mm. Εν συνεχεία οι δοκιμαστικοί σωλήνες (με το Ringer τα σφαιρίδια και τις μεταλλικές επιφάνειες) στροβιλίστηκαν για 2 min ο καθένας σε αναδευτήρα στροβιλισμού (“vortex”) προκειμένου να αποκολληθεί το βιοϋμένιο (Εικόνα 13). Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις και επίστρωση σε τρυβλία για την απαρίθμηση των βακτηρίων.

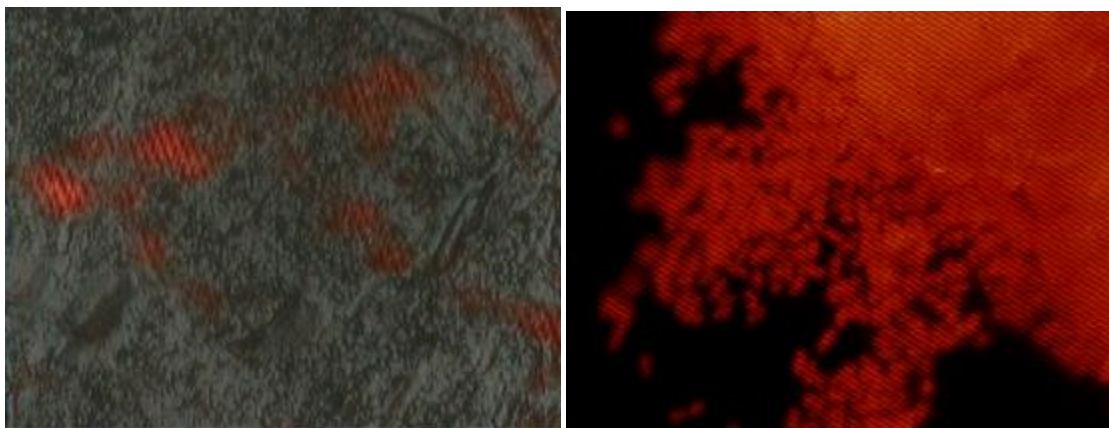


Εικόνα 13. Στροβιλισμός κουπονιού ανοξειδωτού χάλυβα με 10 σφαιρίδια για την αποκόλληση των βιοϋμενικών κυττάρων και τη μεταφορά τους στο υγρό διάλυμα (¼ Ringer)

Χρώση βιοϋμενίου με πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης και παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού

Το κάθε κουπόνι ξεπλύθηκε δύο φορές με 5 ml Ό Ringer για να αφαιρεθούν τα κύτταρα που δεν είναι ισχυρά προσκολλημένα. Το κουπόνι τοποθετήθηκε σε 100 % μεθανόλη για 2 min για μονιμοποίηση των κυττάρων. Η περίσσεια μεθανόλης αποστραγγίστηκε και το κουπόνι αφήθηκε να στεγνώσει. Το κουπόνι κατακλύστηκε με τη χρωστική πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης (Acridine Orange, Remel) επί 2 min.

Τα επιχρίσματα εξετάστηκαν αρχικά σε μεγέθυνση 100 X έως 400 X με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν με εξέταση σε μεγέθυνση 1000 X με ελαιοκαταδυτικό αντικειμενικό φακό. Η χρώση της ακριδίνης είναι ικανή να ανιχνεύει βακτήρια σε πληθυσμούς άνω του 10^4 CFU/ml. Τα βακτήρια χρωματίζονται έντονο πορτοκαλί και το υπόβαθρο εμφανίζεται μαύρο (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14. Βιοϋμένιο *S. Typhimurium* (κόκκινα) σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα μετά τη χρώση με πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης (400 X αριστερή εικόνα) (1000 X δεξιά εικόνα). Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η ανάγλυφη υφή του ανοξείδωτου χάλυβα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3



Μελέτη της γνώμης και της γνώσης των Ελλήνων καταναλωτών ως προς τον ασφαλή χειρισμό τροφίμων

Εισαγωγή

Σήμερα εξαιτίας των ταχέων βελτιώσεων στην τεχνολογία τροφίμων, στις τεχνικές επεξεργασίας και συσκευασίας, εκτεταμένα μέτρα πρόληψης έχουν ληφθεί υπόψη σε ολόκληρη την τροφική αλυσίδα για τη διασφάλιση της ασφάλειας τροφίμων (Aygen, 2012). Εξαιτίας των συστημάτων διαχείρισης τροφίμων, όπως οι Κανόνες Ορθής Υγιεινής και Βιομηχανικής Πρακτικής (Good Hygienic Practices GHP, Good Manufacturing Practices, GMP), τα Συστήματα Ανάλυσης Κινδύνων στα Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου (HACCP) και τα διάφορα Πρότυπα Διασφάλισης Ποιότητας, η βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων είναι ικανή να παράγει τρόφιμα υψηλής ποιότητας και ασφάλειας. Τα ανωτέρω αναφερόμενα συστήματα διασφαλίζουν επίσης την ασφάλεια των τροφίμων στα στάδια της τροφικής αλυσίδας από τους προμηθευτές και τους μεταφορείς στα σημεία λιανικής πώλησης. Παρόλα αυτά, δυνητικά παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να ανιχνεύονται σποραδικά και να οδηγήσουν σε λοίμωξη αν τα τρόφιμα χειρίζονται ακατάλληλα (EUFIC, 2002). Σύμφωνα με τον WHO άνω του 30 % του πληθυσμού στις ανεπτυγμένες χώρες επηρεάζεται από τροφιμογενείς λοιμώξεις κάθε χρόνο (WHO, 2007). Σε αυτές τις χώρες, λάθη που γίνονται κατά την προετοιμασία των τροφίμων σε οικιακό περιβάλλον, στα εστιατόρια και σε άλλους δημόσιους χώρους αποτελούν σημαντική αιτία τροφιμογενών λοιμώξεων (EUFIC, 2002). Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις επηρεάζουν την υγεία και την ευζωία των ανθρώπων, αλλά ταυτόχρονα έχουν οικονομικές συνέπειες στην κοινωνία ως σύνολο, καθώς επιβαρύνουν τα συστήματα υγείας και μειώνουν την παραγωγικότητα στην εργασία (WHO, 2007). Συνεπώς, η ΕΕ και ο WHO υπογραμμίζουν την υπευθυνότητα όλων των μελών από τη φάρμα στο τραπέζι και οι καταναλωτές θα πρέπει να κατανοήσουν τις βασικές οδηγίες κατά την αγορά, μεταφορά, αποθήκευση, προετοιμασία και κατανάλωση τροφίμων, ώστε να διατηρήσουν την ασφάλεια των τροφίμων και την υγεία τους (EUFIC, 2002).

Το θέμα του χειρισμού των τροφίμων, των γνώσεων, των αυτο-αναφερόμενων πρακτικών σε συνδυασμό με τη συμπεριφορά κατά τον χειρισμό των τροφίμων από τους καταναλωτές σε πραγματικό χρόνο έχει μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές (Aygen et al., 2012, Byrd-Bredbenner et al., 2013, Lin et al., 2004, Mazengia et al., 2015, Redmond & Griffith, 2003, van Asselt et al., 2009, Yang et al., 1998) κι έχει αποτιμηθεί ότι η γνώση των καταναλωτών για την ασφάλεια των τροφίμων είναι ανεπαρκής και απαιτείται βελτίωση σε αρκετές περιπτώσεις (Redmond & Griffith, 2003). Ο έλεγχος της θερμοκρασίας, ειδικά σε περιπτώσεις απόψυξης (Boodhu et al., 2008, Bruhn & Schutz, 1999, Jevsnik et al., 2008, Knight et al., 2003, Mc Carthy et al., 2007, Odwin &

Badrie, 2008), φαινόμενα διασταυρούμενης επιμόλυνσης π.χ. χρήση κοινών πάγκων κοπής για ωμά και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα και η τήρηση κανόνων προσωπικής υγιεινής όπως πλύσιμο χεριών (Aiello et al., 2008, Bloomfield et al., 2007, Curtis & Cairncross, 2003, Ejemot et al., 2008, Larson & Aiello, 2001), αποτελούν τα κύρια σημεία διερεύνησης αυτών των μελετών. Αν και οι γνώσεις και οι αυτό-αναφερόμενες συμπεριφορές δεν ανταποκρίνονται πάντα στην πραγματική συμπεριφορά, παρέχουν ενδείξεις αναφορικά με τις γνώσεις των καταναλωτών και το πως τις εφαρμόζουν κατά τη λήψη αποφάσεων. Ακόμη, οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τους καταναλωτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία εκπαιδευτικών προγραμμάτων που θα έχουν ως απώτερο σκοπό να ενημερώσουν ή να παρακινήσουν τους καταναλωτές, ώστε να αλλάξουν τον τρόπο χειρισμού των τροφίμων.

Σκοπός μελέτης

Η πρώτη ερμηνεία του πως τα τρόφιμα χειρίζονται σε οικιακό περιβάλλον προέρχεται κυρίως από μελέτες ερωτηματολογίου και μελέτες άμεσης παρατήρησης (Phang & Bruhn, 2011, Redmond & Griffith, 2003, Redmond et al., 2004, Scott & Herbold, 2010, Worsfold & Griffith, 1997). Συνεπώς, η χρήση ερωτηματολογίου για την αποτύπωση της Ελληνικής πραγματικότητας στον τομέα ασφάλους χειρισμού τροφίμων παρουσιάζει ενδιαφέρον. Μέσω των αποτελεσμάτων που παρείχε η έρευνα αποτιμήθηκαν τα λάθη χειρισμού τροφίμων ή σημεία που δεν είναι επαρκώς κατανοητά κι ενέχουν αβεβαιότητα από τους καταναλωτές. Επιπροσθέτως, έγινε σύγκριση με αποτελέσματα από αντίστοιχες έρευνες που απευθύνονται σε καταναλωτές άλλων χωρών. Αυτή η μελέτη διερεύνησε τις απόψεις, τις γνώσεις και τις αυτό-αναφερόμενες πρακτικές των Ελλήνων καταναλωτών κατά τη διάρκεια προετοιμασίας και αποθήκευσης των τροφίμων. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από συνολικά 400 καταναλωτές που ζουν στην Ελλάδα με τη χρήση αυτό-διαχειριζόμενου, δομημένου διαδικτυακού ερωτηματολογίου, με συστηματική και τυχαία δειγματοληψία. Η έρευνα είχε ως σκοπό να μελετήσει αν υπάρχει σημαντική διαφορά όσον αφορά τις γνώσεις, αντιλήψεις και αυτό-αναφερόμενες πρακτικές ανάμεσα σε αυτούς που είχαν ή όχι τροφολοίμωξη τους τελευταίους 12 μήνες. Επίσης, διερευνήθηκε εάν υπάρχει διαφορά μεταξύ ανδρών ή γυναικών, εργασιακής κατάστασης, επιπέδου εκπαίδευσης και σύσταση νοικοκυριού (ηλικιακές κατηγορίες, παιδιά < 5 ετών).

Μεθοδολογία

Ερευνητικό εργαλείο συλλογής δεδομένων

Στην παρούσα έρευνα επιλέχτηκε η χρήση ερωτηματολογίου καθώς θεωρούνται τα πιο κατάλληλα εργαλεία για τις κοινωνικές επιστήμες και λόγω του ότι κρίνεται εύκολη η συλλογή δεδομένων από ανθρώπους που βρίσκονται σε μεγάλες αποστάσεις. Το ερωτηματολόγιο δημιουργήθηκε με βάση τις γενικές ιδέες του FightBac!™ και συγκεκριμένα εξετάστηκαν όλα τα στάδια (καθαρισμός, διαχωρισμός, ψύξη), εκτός από το μαγείρεμα. Επίσης, έγινε ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και μελέτη άλλων αντίστοιχων ερευνών για τη συλλογή κατάλληλων ερωτήσεων. Το ερωτηματολόγιο διανεμήθηκε και συμπληρώθηκε την περίοδο Απριλίου - Μαΐου 2015.

Τα εργαλείο συλλογής δεδομένων ήταν το ερωτηματολόγιο που παρείχε εννιά ερωτήσεις-ισχυρισμούς (statements) της κλίμακας γνώσης, τέσσερις διατυπωμένες ως θετικές (positive) και πέντε ως αρνητικές (negative) με τιμές μεταβλητής κλίμακας μέτρησης τύπου Likert (1 = διαφωνώ απόλυτα μέχρι 5 = συμφωνώ απόλυτα). Εν συνεχεία, σε κάθε μια από τις θετικές ερωτήσεις αποδόθηκε ο βαθμός 1, 2, 3, 4, 5, ενώ οι αρνητικές ερωτήσεις βαθμολογούνταν αντίστροφα (1 = συμφωνώ απόλυτα έως 5 = διαφωνώ απόλυτα), ώστε πάντα η μεγαλύτερη βαθμολογία να σημαίνει πιο ασφαλείς συνθήκες χειρισμού. Επίσης, υπήρχαν δύο ερωτήσεις-ισχυρισμοί της κλίμακας στάσης κλειστού τύπου (Ναι / Όχι) και δύο ερωτήσεις πολλαπλής επιλογής. Στην κλίμακα στάσης η κωδικοποίηση έγινε ως εξής Λάθος (1) Σωστό (2). Έτσι η συνολική βαθμολογία κυμαίνονταν από 11 έως 49. Το ερωτηματολόγιο διανεμήθηκε για να απαντηθεί στα μέσα κοινωνικής δικτύωσης (Facebook, Twitter) και μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου. Οι καταναλωτές παροτρύνθηκαν να ακολουθήσουν την παρακάτω ηλεκτρονική διεύθυνση <https://safefood.typeform.com/to/AoLjgM> και να το συμπληρώσουν όσο βέβαια το ερωτηματολόγιο είχε καταστεί ως δημόσιο, ώστε να έχουν πρόσβαση όσοι αποτελούσαν το δείγμα του ερωτηματολογίου.

Το διαδίκτυο αποτελεί πλέον ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για τη διεξαγωγή ποσοτικών ερευνών. Στη δεκαετία του τριάντα και του σαράντα οι μοναδικοί τρόποι συλλογής δεδομένων μιας έρευνας ήταν η ταχυδρομική αποστολή των ερωτηματολογίων ή οι συνεντεύξεις με τους ερωτώμενους πηγαίνοντας από πόρτα σε πόρτα. Από τη δεκαετία του εβδομήντα οι τηλεφωνικές συνεντεύξεις έγιναν μια δημοφιλής εναλλακτική λύση, χάρη στη σχεδόν καθολική υιοθέτηση του τηλεφώνου. Σήμερα, καθώς το διαδίκτυο χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο, οι διαδικτυακές έρευνες γίνονται μια όλο και πιο ενδιαφέρουσα επιλογή.

Τα πλεονεκτήματα της διαδικτυακής έρευνας έναντι της συμβατικής έρευνας είναι τα εξής

(Van Selm & Jankowski, 2006, Λιναρδής και συν., 2011):

- Η εξοικονόμηση πόρων (χρημάτων, ανθρώπινου δυναμικού, αναλώσιμων κ.τ.λ.)
- Η εξάλειψη σφαλμάτων κατά την εισαγωγή δεδομένων, αφού γίνεται από τους ίδιους τους ερωτώμενους
- Η αποτελεσματικότητα: γρήγορη συλλογή και αποθήκευση δεδομένων
- Η εύκολη εύρεση ατόμων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και ενδιαφέροντα, για παράδειγμα άτομα τα οποία συμμετέχουν σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα στο ιντερνέτ όπως: forum, ομάδες κοινωνικής δικτύωσης με συγκεκριμένες θεματικές
- Η απουσία μεροληπτικότητας από το πρόσωπο που διενεργεί τη συνέντευξη
- Η επιλογή του τόπου και του χρόνου συμπλήρωσης των ερωτηματολογίων από τους ερωτώμενους
- Η πρόσβαση σε γεωγραφικά κατανεμημένους πληθυσμούς

Τα μειονεκτήματα της διαδικτυακής έρευνας είναι ότι απευθύνεται κυρίως σε νέες ηλικιακές ομάδες (όπου η χρήση του διαδικτύου είναι εκτεταμένη και σε καθημερινή βάση) και η απουσία προσωπικής επαφής με τον ερωτώμενο.

Εγκυρότητα και αξιοπιστία της έρευνας

Αξιοπιστία είναι ο βαθμός στον οποίο ένα τεστ ή μια διαδικασία παράγει τα ίδια αποτελέσματα κάτω από σταθερές συνθήκες σε όλες τις περιπτώσεις, με την ίδια μέθοδο συλλογής δεδομένων και με τα ίδια υποκείμενα στις ίδιες συνθήκες. Είναι φανερό πως ο έλεγχος της εγκυρότητας μιας έρευνας είναι δύσκολο να ελεγχθεί πριν αυτή γίνει. Η εγκυρότητα και αξία της έρευνας θα προκύψει από τη μελέτη των αποτελεσμάτων του δείγματος και τη δυνατότητα γενίκευσής τους και θα εξαρτηθεί και από την αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος.

Ανάλυση δεδομένων

Για τη διερεύνηση της δομικής εγκυρότητας της κάθε θεματικής ενότητας πραγματοποιήθηκε διερευνητική παραγοντική ανάλυση, η οποία εφαρμόζεται όταν η δομή του μοντέλου δεν είναι γνωστή ή προκαθορισμένη και χρησιμοποιούνται τα δεδομένα για να την αποκαλύψουν (Timm, 2002). Για την ολοκλήρωση της παραγοντικής ανάλυσης και τον έλεγχο των αποτελεσμάτων, ακολουθήθηκε συγκεκριμένη διαδικασία και εξετάστηκαν οι κατάλληλοι δείκτες. Συγκεκριμένα:

1) Για την εξαγωγή των παραγόντων εφαρμόστηκε η μέθοδος της Ανάλυσης Βασικών Συνιστωσών (Principal Component Analysis) με Ορθογώνια Περιστροφή των αξόνων με τη μέθοδο Varimax,

η οποία, κατά τους Sharma (1996) και Hair et al. (1995), αποτελεί μία από τις δημοφιλέστερες μεθόδους ορθογώνιας περιστροφής.

Rotated Component Matrix^a

	Component			
	1	2	3	4
Μπορείτε να πείτε με ασφάλεια αν ένα τρόφιμο δεν είναι ασφαλές από την εμφάνισή του.	.827			
Μπορείτε να πείτε με ασφάλεια αν ένα τρόφιμο δεν είναι ασφαλές από την οσμή του.	.756			
Όλα τα βακτήρια που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι επικίνδυνα για τον άνθρωπο.	.715			
Η κατάψυξη σκοτώνει όλα τα βακτήρια που μπορεί να προκαλέσουν τροφική λοίμωξη.	.656			
Είναι επικίνδυνο να χρησιμοποιούμε πάγκο κοπής που φέρει αμυχές.		.774		
Οι πετσέτες- πανάκια της κουζίνας μπορεί να έχουν επικίνδυνα βακτήρια.		.729		
Οι πάγκοι κοπής δεν θα πρέπει να είναι ξύλινοι.		.674		
Το μαγειρεμένο φαγητό θα πρέπει να τοποθετείται στο ψυγείο σε 2 ώρες.			.769	
Το φαγητό που περισσεύει είναι ασφαλές να μείνει στον πάγκο για μερικές ώρες.			.676	
Χρησιμοποιείτε το ίδιο πιάτο για ωμό και μαγειρεμένο κρέας?				.785
Χρησιμοποιείτε την ίδια επιφάνεια κοπής για κρέατα και λαχανικά?				.737

Extraction Method: Principal Component Analysis.

Rotation Method: Varimax with Kaiser Normalization.

a. Rotation converged in 5 iterations.

2) Για τον έλεγχο της Συνολικής Δειγματικής Καταλληλότητας χρησιμοποιήθηκε το μέτρο K.M.O. (Kaiser-Mayer-Olkin), το οποίο είναι το πλέον δημοφιλές διαγνωστικό μέτρο και οι τιμές του κυμαίνονται από 0 έως 1. Δεν υπάρχει στατιστικός έλεγχος για τις τιμές του δείκτη, αλλά οι Kaiser και Rice (1974) συνιστούν να απορρίπτονται τιμές μικρότερες του 0,5.

KMO and Bartlett's Test

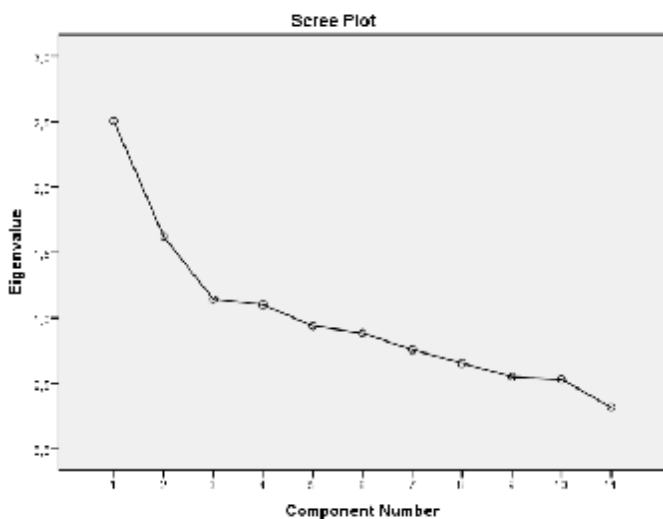
Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.		.657
Bartlett's Test of Sphericity	Approx. Chi-Square	646,736
	df	55
	Sig.	.000

3) Για περαιτέρω και πληρέστερη εξέταση της καταλληλότητας των δεδομένων για παραγοντική ανάλυση, έγινε ο έλεγχος Σφαιρικότητας του Bartlett (Bartlett's Test of Sphericity). Ο έλεγχος αυτός εξετάζει την ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ των μεταβλητών και στην ουσία παρέχει τη στατιστική πιθανότητα, ο πίνακας συσχετίσεων να περιέχει σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ,

τουλάχιστον, κάποιων μεταβλητών.

4) Για τον έλεγχο της καταλληλότητας της κάθε μεταβλητής ξεχωριστά, εξετάστηκαν οι δείκτες M.S.A. (measure of sample adequacy) οι οποίοι πρέπει να είναι μεγαλύτεροι του 0,5 (Hair et al., 1995).

5) Για τον προσδιορισμό του αριθμού των παραγόντων (Factors) έχουν αναπτυχθεί πολλά κριτήρια. Το πλέον δημοφιλές είναι το κριτήριο της ιδιοτιμής (Eigenvalue), σύμφωνα με το οποίο επιλέγουμε μόνο τους παράγοντες των οποίων η τιμή υπερβαίνει το 1 (Sharma, 1996).



Ένα άλλο σημαντικό κριτήριο, για την επιλογή του πλήθους των παραγόντων, είναι το κριτήριο του ποσοστού της Διακύμανσης, το οποίο ερμηνεύουν οι παράγοντες. Δεν είναι ασυνήθιστο, μία λύση που υπολογίζει το 60 % της συνολικής διακύμανσης (και σε κάποιες περιπτώσεις ακόμη λιγότερο) να θεωρείται ικανοποιητική (Hair et al., 1995).

Total Variance Explained

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Multiple Correlations			Rotation Sums of Squared Multiple Correlations		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	2,506	22,770	22,770	2,506	22,770	22,770	2,262	20,565	20,565
2	1,873	17,064	39,832	1,873	17,064	39,832	1,649	14,991	35,556
3	1,142	10,386	47,918	1,142	10,388	47,918	1,246	11,324	46,880
4	1,101	10,005	57,923	1,101	10,005	57,923	1,215	11,043	57,923
5	,839	7,637	65,560						
6	,893	8,031	74,491						
7	,757	6,879	81,370						
8	,653	5,938	87,308						
9	,449	4,052	91,360						
10	,330	3,022	94,382						
11	,217	1,978	96,360						

Extraction Method: Principal Component Analysis

Για τη διερεύνηση της αξιοπιστίας χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης εσωτερικής

συνέπειας του Cronbach (Cronbach's α). Ο δείκτης α είναι ένας δείκτης της εσωτερικής συνέπειας ενός τεστ (internal consistency) και υπολογίζεται από τη συσχέτιση της κάθε ερώτησης του τεστ με την συνολική κλίμακα. Είναι από τις περισσότερο δημοφιλείς τεχνικές υπολογισμού της αξιοπιστίας (Cronbach, 1951). Το συνολικό Cronbach α του ερωτηματολογίου ήταν 0,635, πάνω από το 0,6 όπου είναι το ελάχιστο όριο αξιοπιστίας (Mei et al., 2007) .

Reliability Statistics

Cronbach's Alpha	N of Items
,635	11

Έτσι προέκυψαν τέσσερις εννοιολογικές κατασκευές με συνολικά 11 ερωτήσεις-ισχυρισμούς, σχετικά με τις γνώσεις και πρακτικές χειρισμού σε θέματα ασφάλειας τροφίμων. Οι τρεις πρώτες ανήκουν στην κατηγορία «γνώσεις» και η τέταρτη στις «πρακτικές». Η πρώτη ονομάστηκε «συσχετισμός τροφίμων-μικροοργανισμών» και απαρτίζεται από τις ερωτήσεις 12, 13, 14 και 15. Η δεύτερη καταγράφηκε ως «ασφάλεια επιφανειών, οικιακού εξοπλισμού» και αποτελείται από τις ερωτήσεις 16, 17 και 18. Η τρίτη χαρακτηρίστηκε ως «συντήρηση τροφίμων» και περιλαμβάνει τις ερωτήσεις 19 και 20. Η τέταρτη αναφέρεται ως «διασταυρούμενη επιμόλυνση» και την συνθέτουν οι ερωτήσεις 21 και 22.

Ερωτηματολόγιο

Παρακάτω παρατίθεται το ερωτηματολόγιο (σύνολο 26 ερωτήσεις) σε τρεις διακριτές ενότητες, η πρώτη περιλαμβάνει δημογραφικά στοιχεία (11 ερωτήσεις) και η δεύτερη γνώσεις-απόψεις σε θέματα ασφάλειας τροφίμων (9 ερωτήσεις) που διακρίνονται σε τρεις εννοιολογικές κατασκευές. Η τρίτη ενότητα περιλαμβάνει κατά δήλωση πρακτικές χειρισμού (2 ερωτήσεις σε μια εννοιολογική κατασκευή) και 4 αυτό-αναφερόμενες ερωτήσεις χειρισμού τροφίμων, επιφανειών και προσωπικής υγιεινής.

Δημογραφικά στοιχεία

1. Ποίο είναι το φύλο σας;

- i. 1 = Άνδρας
- ii. 2 = Γυναίκα

2. Ποια είναι η ηλικία σας;

- i. 1 < 19
- ii. 2 = 20-29
- iii. 3 = 30-39
- iv. 4 = 40-49
- v. 5 = 50-59
- vi. 6 > 60

3. Ποιο είναι το μορφωτικό σας επίπεδο;

- i. 1 = δημοτικό
- ii. 2 = γυμνάσιο
- iii. 3 = λύκειο
- iv. 4 = ΑΕΙ-ΤΕΙ
- v. 5 = Μεταπτυχιακό
- vi. 6 = Διδακτορικό

4. Ποια είναι η επαγγελματική σας κατάσταση;

- i. 1 = φοιτητής
- ii. 2 = δημόσιος υπάλληλος
- iii. 3 = ιδιωτικός υπάλληλος
- iv. 4 = οικιακά
- v. 5 = άνεργος
- vi. 6 = ελεύθερος επαγγελματίας

5. Υπάρχουν παιδιά στην οικογένεια κάτω των 5 ετών;

- i. 1 = ναι
- ii. 0 = όχι

6. Υπάρχουν ηλικιωμένοι στην οικογένεια άνω των 60 ετών;

- i. 1 = ναι
- ii. 0 = όχι

7. Υπάρχουν έγκυες στην οικογένεια;

- i. 1 = ναι
- ii. 0 = όχι

8. Είχατε περίπτωση τροφικής λοίμωξης τους τελευταίους 12 μήνες;

- i. 1 = ναι
- ii. 0 = όχι

9. Τι τρόφιμο νομίζετε ότι ευθύνεται για την τελευταία τροφική λοίμωξη που είχατε;

- i. 1 = Τρόφιμο που έφαγα σε εστιατόριο, ταβέρνα ή delivery
- ii. 2 = Τρόφιμο που ετοίμασα στο σπίτι
- iii. 3 = Τρόφιμο που αγόρασα από το δρόμο (π.χ. καντίνα, φούρνος κ.ά.)
- iv. 0 = Δεν είχα ποτέ τροφική λοίμωξη

10. Τι κάνατε στην τελευταία περίπτωση τροφικής λοίμωξης (πολλαπλής επιλογής);

- i. Πήγα στο γιατρό
- ii. Πήγα στο νοσοκομείο
- iii. Συμβουλευτήκα φίλους και συγγενείς
- iv. Συμβουλευτήκα το ιντερνέτ
- v. Τίποτα, περίμενα να περάσουν τα συμπτώματα
- vi. Δεν είχα ποτέ τροφική λοίμωξη

11. Ποιο/ποια από τα παρακάτω βακτήρια που προκαλούν τροφικές λοιμώξεις γνωρίζετε (πολλαπλής επιλογής);

- i. Σαλμονέλλα (*Salmonella*)

- ii. Λιστέρια (*Listeria*)
- iii. Σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus*)
- iv. Κολιβακτηρίδιο (*Escherichia coli*)
- v. Γιερσίνια (*Yersinia*)
- vi. Όλα τα παραπάνω
- vii. Κανένα από τα παραπάνω

Γνώσεις- Απόψεις σε θέματα ασφάλειας τροφίμων

Εννοιολογική κατασκευή Α «Συσχέτισης τροφίμων- μικροοργανισμών»

12. Όλα τα βακτήρια που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι επικίνδυνα για τον άνθρωπο.

- i. Διαφωνώ απόλυτα
- ii. Διαφωνώ
- iii. Ούτε διαφωνώ, ούτε συμφωνώ
- iv. Συμφωνώ
- v. Συμφωνώ απόλυτα

13. Η κατάψυξη σκοτώνει όλα τα βακτήρια που μπορεί να προκαλέσουν τροφική λοίμωξη.

- i. Διαφωνώ απόλυτα
- ii. Διαφωνώ
- iii. Ούτε διαφωνώ, ούτε συμφωνώ
- iv. Συμφωνώ
- v. Συμφωνώ απόλυτα

14. Μπορείτε να πείτε με ασφάλεια αν ένα τρόφιμο δεν είναι ασφαλές από την εμφάνισή του.

- i. Διαφωνώ απόλυτα
- ii. Διαφωνώ
- iii. Ούτε διαφωνώ, ούτε συμφωνώ
- iv. Συμφωνώ
- v. Συμφωνώ απόλυτα

15. Μπορείτε να πείτε με ασφάλεια αν ένα τρόφιμο δεν είναι ασφαλές από την οσμή του.

- i. Διαφωνώ απόλυτα

- ii. Διαφωνώ
- iii. Ούτε διαφωνώ, ούτε συμφωνώ
- iv. Συμφωνώ
- v. Συμφωνώ απόλυτα

Εννοιολογική κατασκευή Β «Ασφάλεια επιφανειών, οικιακού εξοπλισμού»

16. Οι πάγκοι κοπής δεν θα πρέπει να είναι ξύλινοι.

- i. Διαφωνώ απόλυτα
- ii. Διαφωνώ
- iii. Ούτε διαφωνώ, ούτε συμφωνώ
- iv. Συμφωνώ
- v. Συμφωνώ απόλυτα

17. Είναι επικίνδυνο να χρησιμοποιούμε πάγκο κοπής που φέρει αμυχές.

- i. Διαφωνώ απόλυτα
- ii. Διαφωνώ
- iii. Ούτε διαφωνώ, ούτε συμφωνώ
- iv. Συμφωνώ
- v. Συμφωνώ απόλυτα

18. Οι πετσέτες-πανάκια της κουζίνας μπορεί να έχουν επικίνδυνα βακτήρια.

- i. Διαφωνώ απόλυτα
- ii. Διαφωνώ
- iii. Ούτε διαφωνώ, ούτε συμφωνώ
- iv. Συμφωνώ
- v. Συμφωνώ απόλυτα

Εννοιολογική κατασκευή Γ «Συντήρησης τροφίμων»

19. Το μαγειρεμένο φαγητό θα πρέπει να τοποθετείται στο ψυγείο σε 2 h.

- i. Διαφωνώ απόλυτα

- ii. Διαφωνώ
- iii. Ούτε διαφωνώ, ούτε συμφωνώ
- iv. Συμφωνώ
- v. Συμφωνώ απόλυτα

20. Το φαγητό που περισσεύει είναι ασφαλές να μείνει στον πάγκο για μερικές ώρες.

- i. Διαφωνώ απόλυτα
- ii. Διαφωνώ
- iii. Ούτε διαφωνώ, ούτε συμφωνώ
- iv. Συμφωνώ
- v. Συμφωνώ απόλυτα

Κατά δήλωση πρακτικές χειρισμού

Εννοιολογική κατασκευή Δ «Διασταυρούμενη επιμόλυνση»

21. Χρησιμοποιείτε την ίδια επιφάνεια κοπής για κρέατα και λαχανικά;

- i. 1 = ναι
- ii. 0 = όχι

22. Χρησιμοποιείτε το ίδιο πιάτο για ωμό και μαγειρεμένο κρέας;

- i. 1 = ναι
- ii. 0 = όχι

23. Πλένετε τα χέρια σας πριν και κατά τη διάρκεια προετοιμασίας φαγητού;

- i. 1 = Ναι, τα πλένω με νερό και σαπούνι και τα σκουπίζω
- ii. 2 = Ναι, τα πλένω με νερό και σαπούνι αλλά δεν τα σκουπίζω
- iii. 3 = Ναι, τα ξεπλένω με νερό
- iv. 4 = Όχι, μόνο τα σκουπίζω στην πετσέτα κουζίνας
- v. 5 = Όχι, δεν τα πλένω

24. Τι είδους πάγκο κοπής χρησιμοποιείτε (πολλαπλής επιλογής);

- i. Πλαστικό ή teflon
- ii. Ξύλινο

- iii. Γυάλινο
- iv. Ανοξειδωτη επιφάνεια
- v. Δεν έχω πάγκο κοπής

25. Σε περίπτωση που κόψετε σε ένα πάγκο κοπής ωμό κρέας και πριν χειριστείτε άλλα τρόφιμα που θα καταναλωθούν ωμά...

- i. 1 = Είναι απαραίτητο να πλένετε τον πάγκο κοπής με σαπούνι ή στο πλυντήριο πιάτων
- ii. 2 = Ψεκάζετε με απολυμαντικό και σκουπίζετε με χαρτί
- iii. 3 = Αρκεί το ξέπλυμα με νερό πριν το χρησιμοποιήσετε
- iv. 4 = Μπορείτε να χρησιμοποιήσετε τον ίδιο πάγκο κοπής

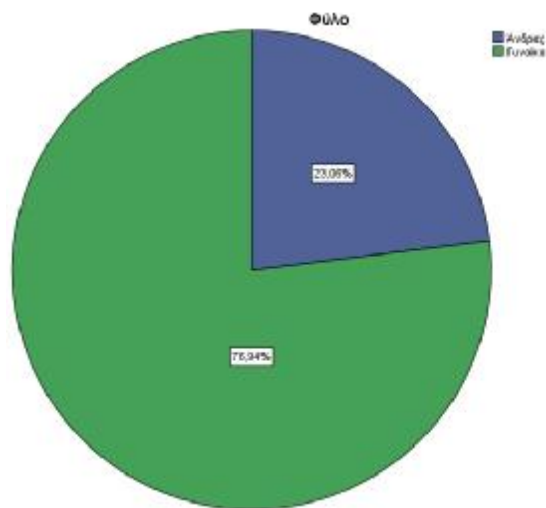
26. Που τοποθετείτε τα κατεψυγμένα τρόφιμα για να ξεπαγώσουν (πολλαπλής επιλογής);

- i. Στο ψυγείο
- ii. Στον πάγκο της κουζίνας
- iii. Σε ζεστό ή κρύο νερό
- iv. Στο φούρνο μικροκυμάτων

Αποτελέσματα και συζήτηση

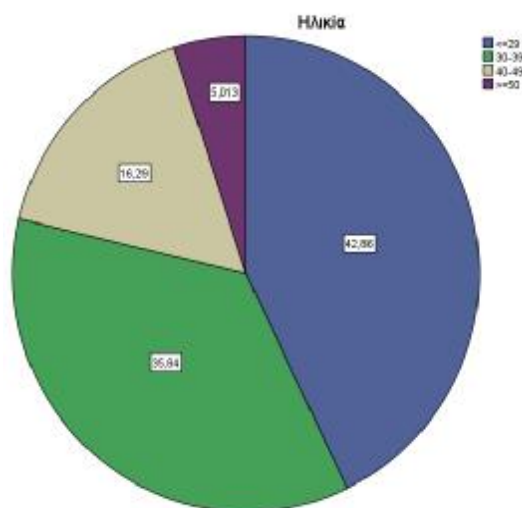
Δημογραφικά χαρακτηριστικά των καταναλωτών

Σύμφωνα με τα δημογραφικά στοιχεία λάβαμε τις εξής απαντήσεις όσον αφορά το φύλο: 77 % γυναίκα, 23% άνδρας. Είναι αναμενόμενο, λόγω της φύσης του αντικειμένου, οι γυναίκες να δείξουν περισσότερο ενδιαφέρον στη συμπλήρωση του ερωτηματολογίου και να αποτελούν τα $\frac{3}{4}$ του δείγματος.



Διάγραμμα 1. Απαντήσεις στην ερώτηση 1 «Ποιο είναι το φύλο σας;»

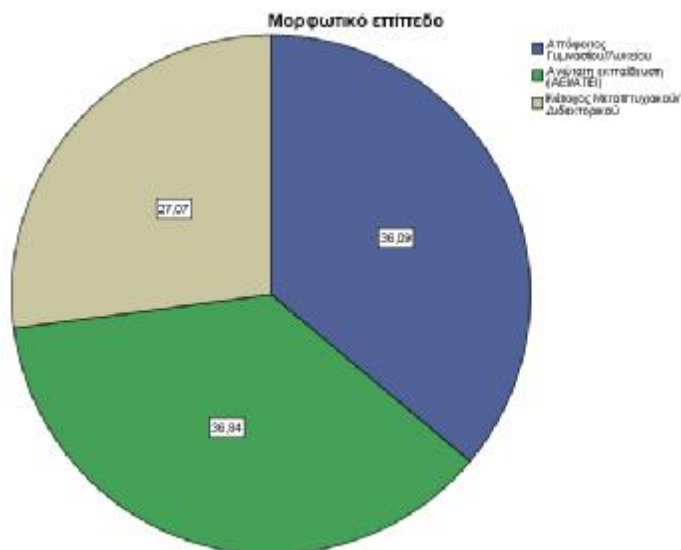
Όσον αφορά την ηλικία των ερωτηθέντων, τα δεδομένα συγχωνεύτηκαν από έξι κατηγορίες (<19, 19-29, 30-39, 40-49, 50-59 και >60), σε τέσσερις κατηγορίες (<29, 30-39, 40-49 και >50). Συγκεκριμένα οι καταναλωτές έως 29 ετών κατείχαν ποσοστό 42,9 %, από 30-39 (35,8 %), 40-49 (16,3 %) και >50 (5 %).



Διάγραμμα 2. Απαντήσεις στην ερώτηση 2 «Ποια είναι η ηλικία σας;»

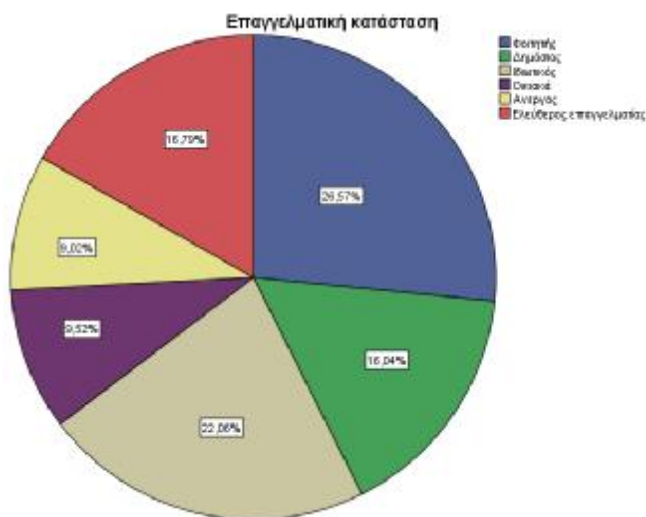
Όσον αφορά το μορφωτικό επίπεδο από πέντε κατηγορίες (απόφοιτος δημοτικού, απόφοιτος λυκείου, απόφοιτος ΑΕΙ/ΑΤΕΙ, κάτοχος μεταπτυχιακού, κάτοχος διδακτορικού) επιλέχθηκαν τρεις τελικές κατηγορίες (απόφοιτος γυμνασίου/λυκείου, απόφοιτος ανώτατης εκπαίδευσης (ΑΕΙ/ΑΤΕΙ), απόφοιτος μεταπτυχιακού/διδακτορικού). Σύμφωνα με τα δεδομένα που συλλέχθηκαν εκ των ερωτηθέντων ποσοστό 36,1 % έχουν ολοκληρώσει τη μέση εκπαίδευση, 36,8 % έχουν αποφοιτήσει

από ΑΕΙ/ΑΤΕΙ και 27,1 % είναι κάτοχοι μεταπτυχιακού/διδακτορικού.



Διάγραμμα 3. Απαντήσεις στην ερώτηση 3 «Ποιο είναι το μορφωτικό σας επίπεδο (βαθμίδα εκπαίδευσης που έχετε ολοκληρώσει);»

Όσον αφορά την επαγγελματική κατάσταση των ερωτηθέντων καταγράφηκαν τα εξής ποσοστά: φοιτητής (26,6 %), δημόσιος υπάλληλος (16 %), ιδιωτικός υπάλληλος (22,1 %), οικιακά (9,5 %), άνεργος (9 %) και ελεύθερος επαγγελματίας (16,8 %).

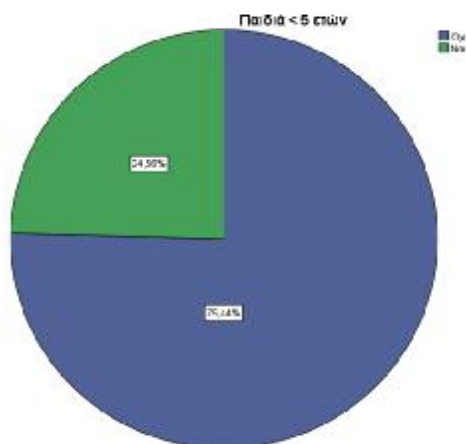


Διάγραμμα 4. Απαντήσεις στην ερώτηση 4 «Ποια είναι η επαγγελματική σας κατάσταση;»

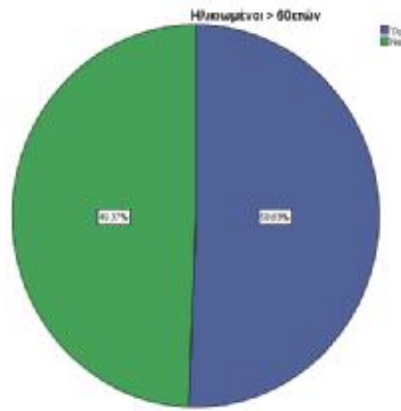
Ορισμένες κατηγορίες ανθρώπων, όπως είναι τα παιδιά <5 ετών, οι έγκυες γυναίκες, οι ηλικιωμένοι >60 ετών και οι ανοσοκατεσταλμένοι είναι ομάδες υψηλού κίνδυνου όσον αφορά τις

τροφολοιμώξεις. Η δριμύτητα των συμπτωμάτων και τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας σε αυτούς τους πληθυσμούς (π.χ. λιστερίωση) προϋποθέτουν αυξημένα μέτρα ασφάλειας και πρόληψης των τροφιμογενών λοιμώξεων. Για την ανίχνευση του ποσοστού των οικογενειών που βρίσκονται σε αυτές τις ομάδες έγιναν οι ερωτήσεις 5, 6, 7. Για την ομάδα των ανοσοκατεσταλμένων λόγω νοσήματος δεν έγινε κάποια ερώτηση καθώς κρίθηκε ότι αφορά ευαίσθητα προσωπικά/ιατρικά δεδομένα. Μία στις τέσσερις οικογένειες είχε παιδιά κάτω των 5 ετών, οι μισές οικογένειες είχαν ηλικιωμένους άνω των 60 ετών και 4 % των ερωτηθέντων είχαν έγκυες στην οικογένεια τους.

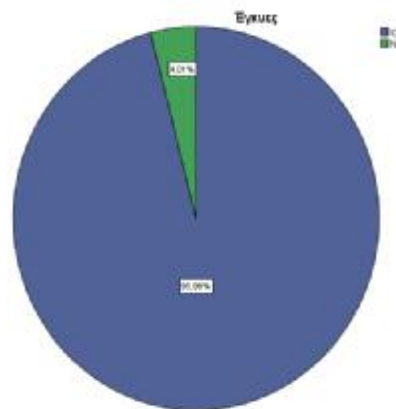
Επιπλέον, πολλοί άνθρωποι ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου ως προς τις τροφιμογενείς λοιμώξεις. Για παράδειγμα, 14,5 % του πληθυσμού των Η.Π.Α. είναι άνω των 65 ετών και 6,2 % κάτω των 5 ετών (U.S. Census Bureau, 2014), σχεδόν 4 εκατομμύρια γυναίκες είναι έγκυες κάθε χρόνο (National Center for Health Statistics, 2014) και 1 % είναι ανοσοκατεσταλμένοι εξαιτίας κάποιας ασθένειας, θεραπευτικής αγωγής και/ή μεταμόσχευσης οργάνου (Kunisaki et al., 2009). Ωστόσο, πολλοί καταναλωτές, ακόμη και αυτοί που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου, δεν εκλαμβάνουν τους εαυτούς τους ή τα μέλη της οικογένειάς τους ως ευαίσθητα στις τροφολοιμώξεις (Buffer et al., 2013), θεωρούν ότι διατρέχουν χαμηλότερο κίνδυνο (Frewer et al., 1994) κι έτσι δεν ακολουθούν τις προτεινόμενες πρακτικές ασφάλειας τροφίμων (Jevnsnik et al., 2008) και συνεπώς δεν παίρνουν επαρκείς προφυλάξεις.



Διάγραμμα 5. Απαντήσεις στην ερώτηση 5 «Υπάρχουν παιδιά στην οικογένεια κάτω των 5 ετών;»



Διάγραμμα 6. Απαντήσεις στην ερώτηση 6 «Υπάρχουν ηλικιωμένοι στην οικογένεια άνω των 60 ετών;»



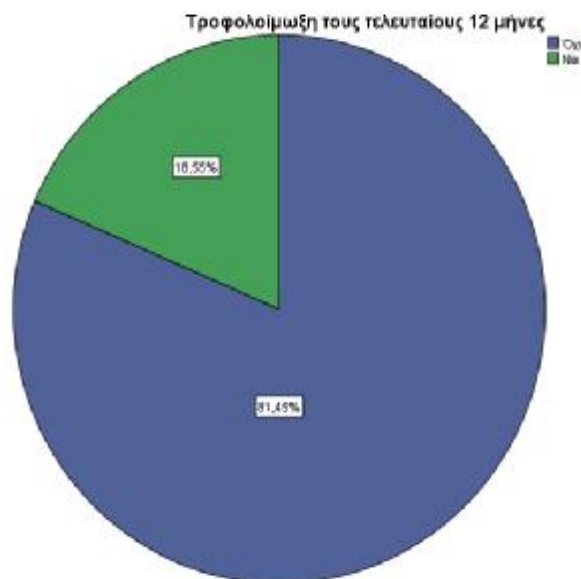
Διάγραμμα 7. Απαντήσεις στην ερώτηση 7 «Υπάρχουν έγκυες στην οικογένεια;»

Από τις ερωτήσεις 8, 9 προκύπτει ότι ποσοστό 19 % είχε τροφολοίμωξη τους τελευταίους 12 μήνες και 50 % δεν είχε ποτέ τροφολοίμωξη. Σε μια έρευνα που έγινε σε 400 καταναλωτές στην Κωνσταντινούπολη το 2012, 1/3 εξ αυτών (ποσοστό 32,3 %) είχε τροφολοίμωξη τους τελευταίους 12 μήνες (Aygen et al., 2012).

Αν και οι ειδικοί γενικώς συμφωνούν ότι το σπίτι είναι ένας από τους κύριους χώρους όπου οι περισσότερες τροφολοιμώσεις παρατηρούνται (Bryan, 1988, Byrd-Bredbenner, 2007a, Byrd-Bredbenner, 2007b, FAO/WHO, 2002, Kennedy et al., 2005, Knabel, 1995, Maurer et al., 2008, McArthur et al., 2006, Redmond & Griffith, 2009), πολλοί καταναλωτές δεν το θεωρούν σαν επικίνδυνο μέρος για τροφολοιμώσεις (Worsfold & Griffin, 1997). Η πλειοψηφία των καταναλωτών αμφισβητούν την πιθανότητα κάποιο μέλος της οικογένειας τους με συμπτώματα «ίωσης» (π.χ. πυρετό, ρίγη και ναυτία) να έχει τροφολοίμωξη που προκλήθηκε από τρόφιμα που παρασκευάστηκαν στο σπίτι (ADAF, 1999, Cody & Hogue, 2003, Kurtzweil, 2012). Το 2011, μόνο 8 % των καταναλωτών πίστευαν ότι το σπίτι είναι ένας πιθανός χώρος να συμβεί

τροφιμογενής λοίμωξη (Food Marketing Institute, 2011). Μια μελέτη που συμπεριλάμβανε 1000 περιπτώσεις τροφιμογενών λοιμώξεων έδειξε ως κυριότερη πηγή προέλευσης των περιστατικών το οικιακό περιβάλλον (19,7 %), εν συνεχεία τα εστιατόρια (17,1 %) και τις δεξιώσεις (12,2 %) (Roberts, 1982). Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των χωρών, με τις περισσότερες να αναφέρουν ποσοστά μεταξύ 10-50 % των επιδημιών να σχετίζονται με οικιακό περιβάλλον (Redmond & Griffith, 2003). Μόνο 12 % των καταναλωτών πιστεύουν ότι το σπίτι είναι ένας χώρος πολύ πιθανός για τους ανθρώπους να πάθουν τροφική λοίμωξη (Food Marketing Institute, 2011) και μόνο το 7 % αυτών που είχαν τροφική λοίμωξη τους 12 τελευταίους μήνες ανέφεραν ότι πιθανόν να οφειλόταν σε τρόφιμα που κατανάλωσαν στο σπίτι στις Η.Π.Α. (Brewer & Rojas, 2008). Ομοίως, το αντίστοιχο ποσοστό για τους Ευρωπαίους ήταν 12 % (De Jong, 2008). Υπάρχουν πολλοί λόγοι που το οικιακό περιβάλλον σχετίζεται με σημαντική επικινδυνότητα ως προς τις τροφιμογενείς λοιμώξεις.

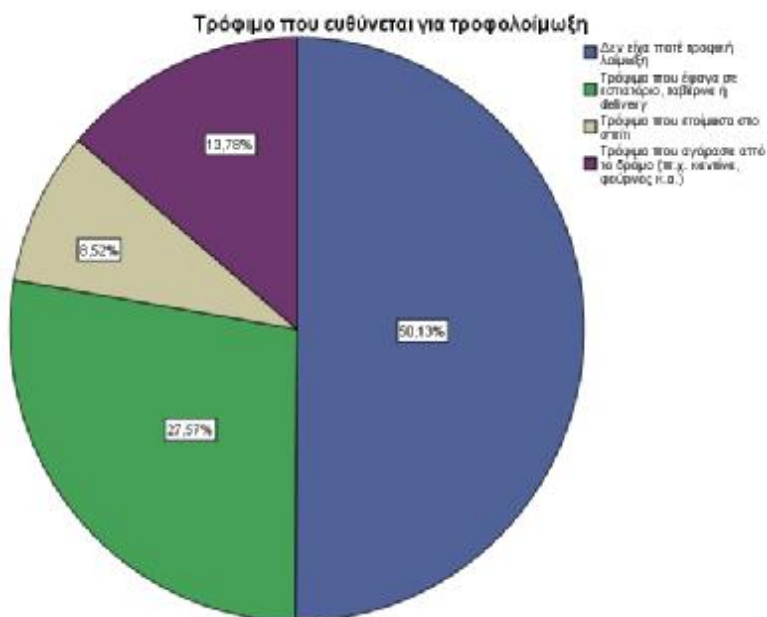
Η μεγαλύτερη ποσότητα των τροφίμων που τρώμε (72-93 %) προετοιμάζεται και καταναλώνεται στο σπίτι κι έτσι αυξάνεται η πιθανότητα να συμβούν λάθη χειρισμού τροφίμων (Carlson et al., 2002). Αντιθέτως με τους χώρους μαζικής εστίασης, οι οικιακές κουζίνες είναι χώροι πολυ-λειτουργικοί και πολύ περισσότερο από χώρους προετοιμασίας και αποθήκευσης τροφίμων (Byrd-Bredbenner 2007b, Redmond & Griffith, 2009). Τουλάχιστον δύο μελέτες υποστηρίζουν ότι η κουζίνα είναι πιο επιμολυσμένη από εντεροβακτηριοειδή από τις τουαλέτες (Ojima et al., 2002, Rusin et al., 1998).



Διάγραμμα 8. Απαντήσεις στην ερώτηση 8 «Είχατε περίπτωση τροφικής λοίμωξης τους τελευταίους 12

μήνες;»

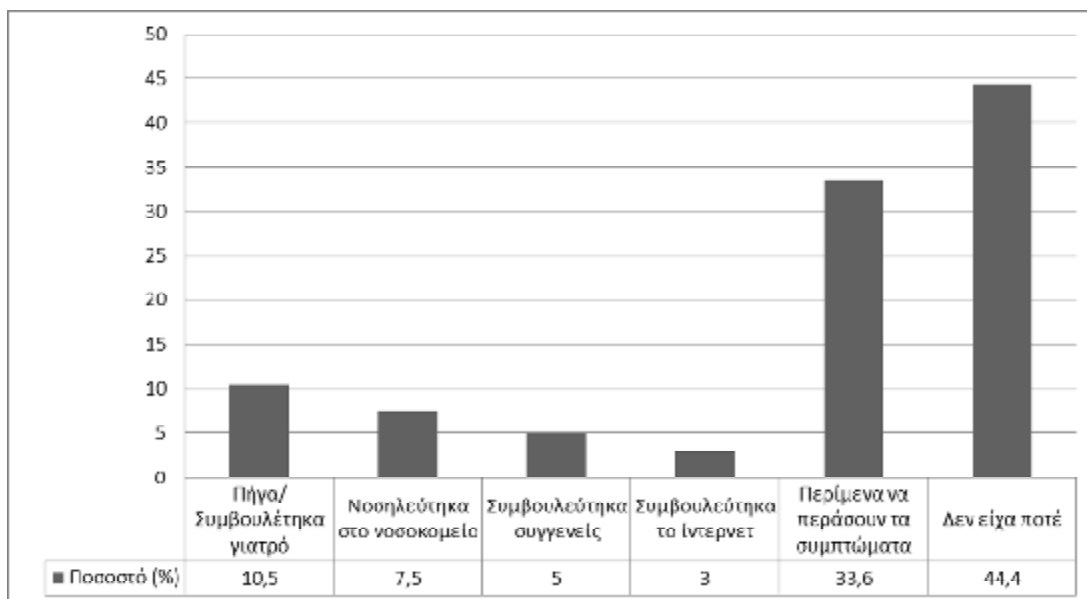
Από το 55,6 % που είχαν τουλάχιστον μια φορά στη ζωή τους τροφολοίμωξη, το 33,6 % απλώς περίμενε να περάσουν τα συμπτώματα, το 10,5 % αναζήτησε ιατρική συμβουλή, το 7,5 % νοσηλεύτηκε στο νοσοκομείο, το 5 % συμβουλευτήκε συγγενείς και το 3 % το ιντερνέτ. Ανάγοντας το ποσοστό μόνο σε αυτούς που είχαν τροφολοίμωξη εξάγεται το συμπέρασμα ότι πιθανόν σε ποσοστό 60,4 % η δριμύτητα των συμπτωμάτων της τροφολοίμωξης δεν ήταν υψηλή για την ομάδα που δεν έκανε κάποια ενέργεια. Ωστόσο, το 18,8 % ζήτησε ιατρική συμβουλή πιθανόν λόγω παρατεταμένης διάρκειας ή σοβαρότητας των συμπτωμάτων και το 13,5 % νοσηλεύτηκε στο νοσοκομείο.



Διάγραμμα 9. Απαντήσεις στην ερώτηση 9 «Τι τρόφιμο νομίζετε ότι ευθύνεται για την τελευταία τροφική λοίμωξη που είχατε;»

Συνεπώς, μόνο το 13,5 % αυτών που εκδήλωσαν συμπτώματα τροφολοίμωξης χρειάστηκε να νοσηλευτεί σε νοσηλευτικό ίδρυμα, όπου υπάρχει δυνατότητα να καταγραφούν και να διερευνηθούν επιδημιολογικά τα κρουσμάτα. Άρα, το μειωμένο ποσοστό που δηλώθηκε σε σχέση με το σύνολο των νοσούντων, πιθανόν να συνδέεται με την παρατηρούμενη υποδήλωση των τροφιμογενών νοσημάτων, που καταγράφεται από το ΚΕΕΛΠΝΟ. Στο σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων (ΥΔΝ) περιλαμβάνονται εννέα τροφιμογενή νοσήματα ανάμεσα τους η σαλμονέλωση, η λιστερίωση και η λοίμωξη από εντερο-αιμορραγικό κολοβακτηρίδιο. Επειδή οι περισσότερες τροφιμογενείς λοιμώξεις είναι σποραδικές, μέτριας βαρύτητας, χωρίς διάγνωση και

καταγραφή, οι ειδικοί εκτιμούν ότι στην πραγματικότητα το ποσοστό των περιπτώσεων που οφείλονται σε λάθη χειρισμού σε οικιακό επίπεδο είναι αυξημένο (FAO/WHO, 2002, Kennedy et al., 2005, Nesbitt et al., 2009, Redmond et al., 2004, Redmond & Griffith, 2009, Scott, 2003).



Διάγραμμα 10. Απαντήσεις στην ερώτηση 10 «Τι κάνατε στην τελευταία περίπτωση τροφικής λοίμωξης (πολλαπλής επιλογής);»

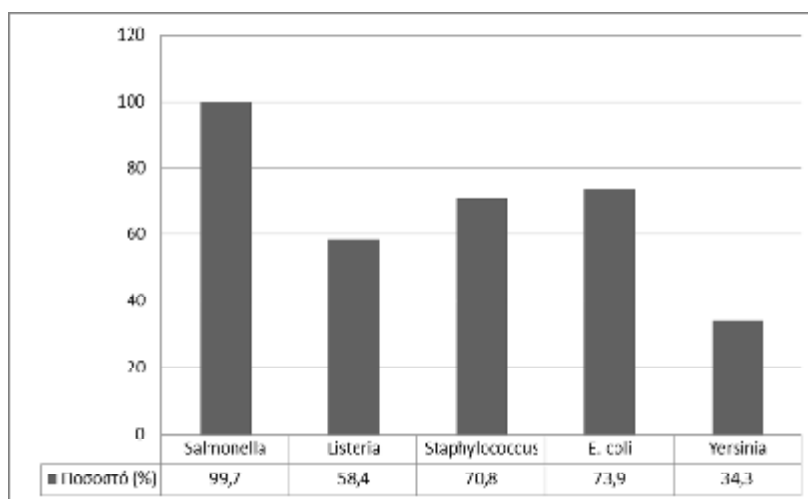
Ποσοστό 99,7 % των ερωτηθέντων γνώριζε την σαλμονέλα, 73,9 % το κολιβακτηρίδιο, 58,4 % τη λιστέρια, 70,8 % τον σταφυλόκοκκο και 34,3 % την υερσίνια. Σε σύγκριση με άλλες μελέτες, διακρίνουμε ότι με την πάροδο του χρόνου οι καταναλωτές είναι πιο ενημερωμένοι όσον αφορά τη γνώση συγκεκριμένων παθογόνων. Σε μια τηλεφωνική μελέτη στο Τέξας το 1991, 78 % των ερωτηθέντων γνώριζαν τη σαλμονέλα, 30 % τη *E. coli* και 21 % την λιστέρια (McIntosh et al., 1994). Σε μια άλλη μελέτη σε 2992 καταναλωτές στις Η.Π.Α. το 2001, 94 % γνώριζαν τη *Salmonella*, 90 % την *E. coli* και 32 % τη *Listeria* (Lin et al., 2005). Σε μια τηλεφωνική μελέτη στην Αυστραλία, 96 % των καταναλωτών ήταν ενημερωμένοι για τη σαλμονέλα, 32 % για τη λιστέρια και 52 % για την *E. coli* (Jay et al., 1999). Ποσοστό 95 % γνώριζε ότι η *Salmonella* αποτελεί αίτιο τροφικής λοίμωξης σε μια έρευνα που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο (Mathias et al., 1999). Από τις παραπάνω μελέτες φαίνεται, ότι πάρα τις παρατηρούμενες διαφορές στα ποσοστά, η κατάταξη των παθογόνων είναι ίδια και συγκεκριμένα η πλειοψηφία των καταναλωτών αναγνωρίζει τη σαλμονέλα και σε χαμηλότερο ποσοστό το κολιβακτηρίδιο και τη λιστέρια. Μια άλλη μελέτη που αφορούσε 440 καταναλωτές στην Κωνσταντινούπολη αναφέρει ποσοστά αναγνωσιμότητας της *E.coli* (66,7 %), της *Salmonella* (20,6 %) και της *Listeria* (6,4 %) (Aygen et al., 2012). Το χαμηλό μορφωτικό επίπεδο των ερωτηθέντων (1/3 αυτών είχαν ολοκληρώσει

μόνο την υποχρεωτική εκπαίδευση, 1/3 την μέση και 1/3 την ανώτερη εκπαίδευση) πιθανόν να αιτιολογεί τα μειωμένα ποσοστά γνώσης των παραπάνω βακτηρίων.

Κρούσματα τροφολοιμώξεων και ειδικά αυτά που αφορούν πολλούς καταναλωτές και προκαλούν υψηλή θνησιμότητα αναπαράγονται συχνά από τα μέσα μαζικής ενημέρωσης. Επιπλέον, πολλοί καταναλωτές ενημερώνονται για θέματα ασφάλειας τροφίμων (π.χ. ανακλήσεις επικίνδυνων τροφίμων, κρούσματα τροφολοιμώξεων) μέσω διαδικτύου κι έτσι αναγνωρίζουν πιο εύκολα τα ονόματα παθογόνων που έχουν συσχετίσει με πρόσφατα περιστατικά.

Η γνώση των τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων πιθανόν να έχει θετική επίδραση στη μείωση των τροφιμογενών λοιμώξεων. Οι Altekruze et al. (1996) ανέφεραν ότι αυτοί που γνώριζαν τη *Salmonella* και τη συσχέτισαν με ένα επικίνδυνο τρόφιμο ήταν πιο πιθανό από άλλους να (1) πλένουν τα χέρια τους μετά το χειρισμό ωμών τροφίμων, (2) να πλένουν ή να αλλάζουν πάγκο κοπής μετά τη χρήση ωμού κρέατος, (3) να θεωρούν ότι το πλύσιμο των χεριών μειώνει τον κίνδυνο τροφολοιμώξεων, (4) να θεωρούν ότι το επαρκές ψήσιμο του κρέατος μειώνει τις πιθανότητες τροφολοιμώξεως και (5) να πιστεύουν ότι η τοποθέτηση στο ίδιο πιάτο όπου είχε χειριστεί ωμό κρέας, μαγειρεμένου κρέατος, αυξάνει τον κίνδυνο τροφολοιμώξεως. Μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι τροφιμογενή παθογόνα έχουν απομονωθεί από οικιακό περιβάλλον. Συγκεκριμένα σε άρθρο του Rallof (1996) περιγράφεται μελέτη του Enriquez όπου βρήκε ότι στην πλειοψηφία από τα 75 πανάκια κουζίνας και τα 325 σφουγγάρια ανιχνεύθηκε *E. coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. και *Staphylococcus* spp. Σε μια άλλη μελέτη που συμπεριλάμβανε 213 οικίες, 21 % των επιφανειών (όπως νεροχύτες και πανάκια κουζίνας) που μελετήθηκαν ανιχνεύθηκαν θετικές για *L. monocytogenes* (Beumer et al., 1997). Τα προγράμματα εκπαίδευσης καταναλωτών έχουν ως στόχο την προώθηση ασφαλών πρακτικών χειρισμού τροφίμων και την αύξηση του ποσοστού γνώσης των τροφιμογενών βακτηρίων, τα οποία και τα δυο συνεισφέρουν στη μείωση τροφιμογενών λοιμώξεων.

Όσον αφορά τα δημογραφικά στοιχεία μόνο το μορφωτικό επίπεδο φάνηκε να επηρεάζει την γνώση των ερωτηθέντων σχετικά με τα τροφιμογενή παθογόνα. Σχετικά με τη γνώση της σαλμονέλας και του σταφυλόκοκκου δεν παρατηρούνται διαφορές σε σχέση με το μορφωτικό επίπεδο. Ωστόσο, τα ποσοστά της γνώσης της υερσίνια και του κολιβακτηριδίου διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ απόφοιτων μέσης εκπαίδευσης και κατόχων μεταπτυχιακού/διδακτορικού. Στη περίπτωση της λιστέριας στατιστικώς σημαντικά μειωμένη αναγνώριση του παθογόνου παρατηρείται στους αποφοίτους γυμνασίου/λυκείου σε σχέση με τις άλλες δυο κατηγορίες.

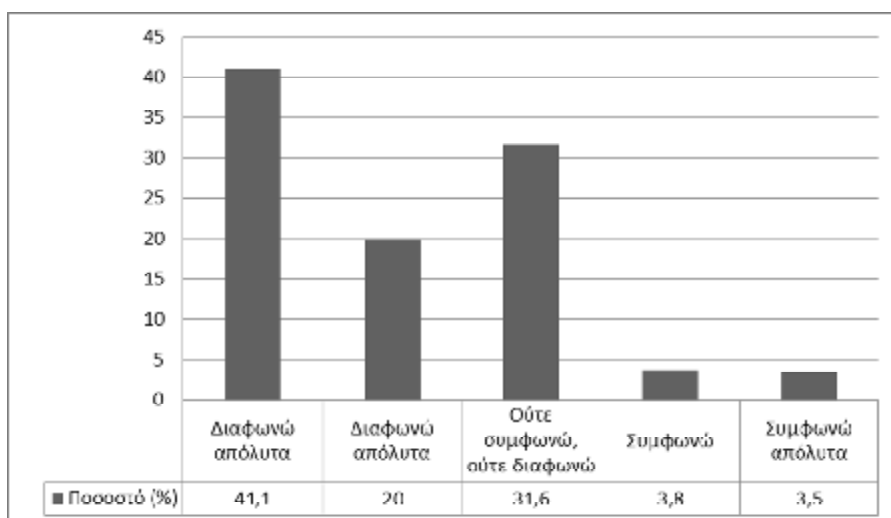


Διάγραμμα 11. Απαντήσεις στην ερώτηση 11 «Ποιο/ποια από τα παρακάτω βακτήρια που προκαλούν τροφικές λοιμώξεις γνωρίζετε (πολλαπλής επιλογής);»

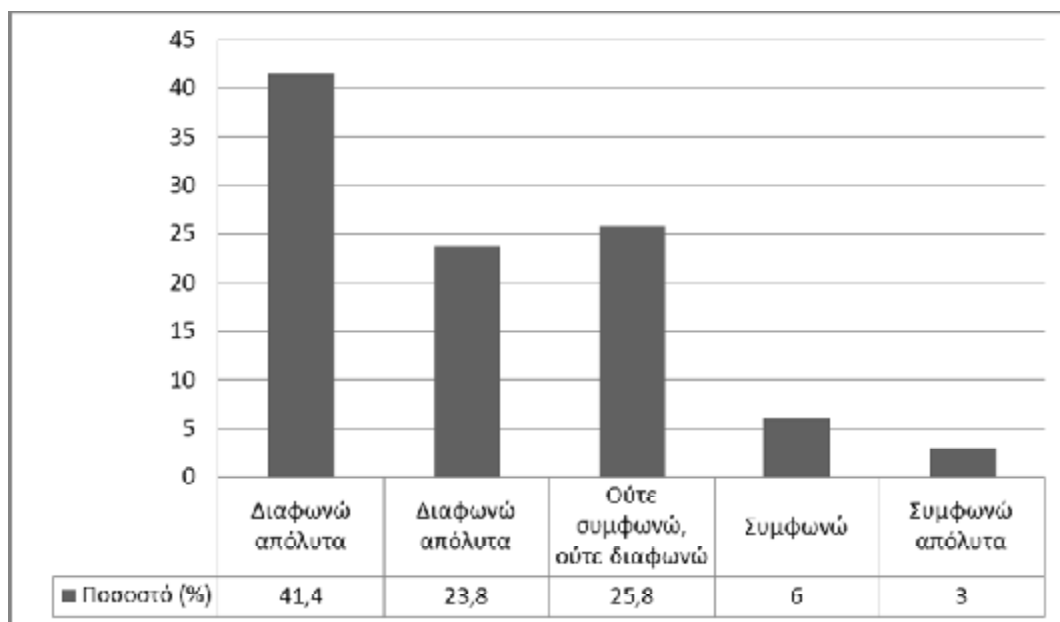
Γνώσεις- Απόψεις σε θέματα ασφάλειας τροφίμων

Εννοιολογική κατασκευή Α «Συσχετισμός τροφίμων-μικροοργανισμών»

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ερωτήσεων 12 και 13, περίπου 2/3 των ερωτηθέντων διαφωνούν/ διαφωνούν απόλυτα ότι όλα τα βακτήρια που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι επικίνδυνα και ότι η κατάψυξη σκοτώνει όλα τα βακτήρια που μπορεί να προκαλέσουν τροφολοιμώξεις, ωστόσο το 1/3 ούτε συμφωνεί, ούτε διαφωνεί.

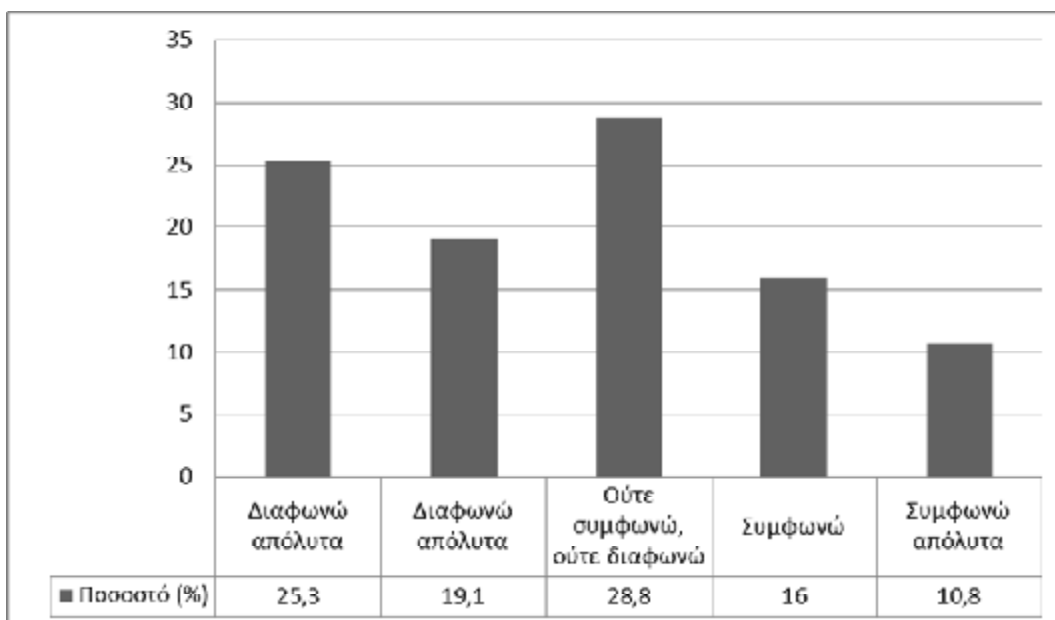


Διάγραμμα 12. Απάντησεις στον ισχυρισμό 12 «Όλα τα βακτήρια που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι επικίνδυνα για τον άνθρωπο.»

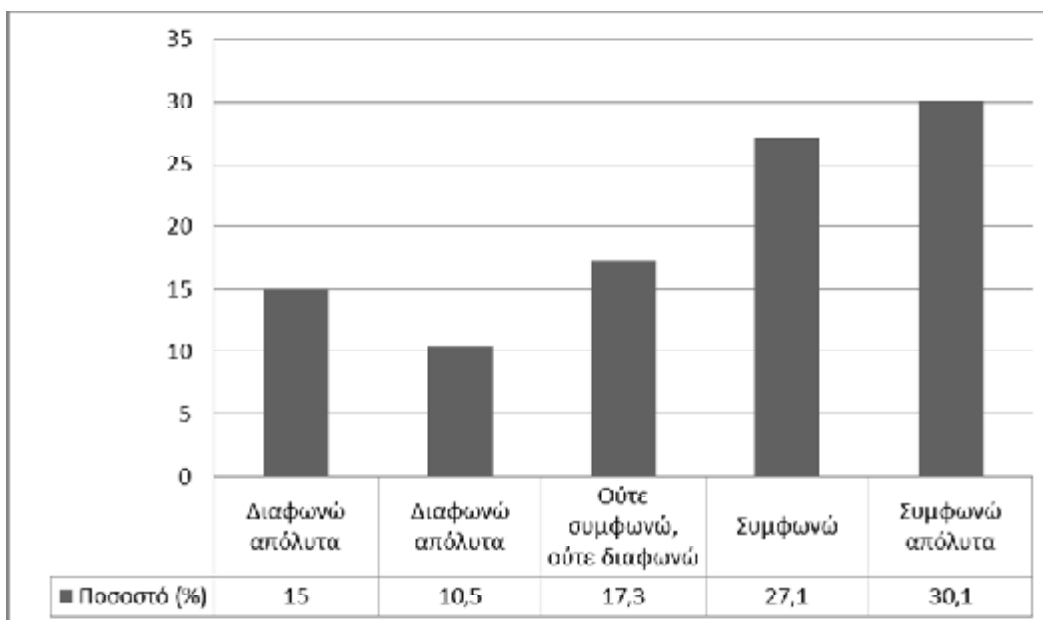


Διάγραμμα 13. Απαντήσεις στο ισχυρισμό 13 «Η κατάψυξη σκοτώνει όλα τα βακτήρια που μπορεί να προκαλέσουν τροφική λοίμωξη».

Από τις ερωτήσεις 14 και 15 προκύπτει ότι οι καταναλωτές σε ποσοστό 44,4 % διαφωνούν/διαφωνούν απόλυτα ότι κάποιος μπορεί να αναγνωρίσει αν ένα τρόφιμο είναι ασφαλές από την εμφάνιση, αλλά από την άλλη πλευρά, το αντίστοιχο ποσοστό όσον αφορά από την οσμή του είναι 25,6%. Προκαλείται λοιπόν μια σύγχυση των καταναλωτών, οι οποίοι πιστεύουν ότι ένα τρόφιμο το οποίο φέρει παθογόνους μικροοργανισμούς μπορεί να μην φέρει κάποια αλλαγή στην εμφάνισή του, αλλά είναι πιο πιθανόν να έχει άσχημη οσμή.



Διάγραμμα 14. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 14 «Μπορείτε να πείτε με ασφάλεια αν ένα τρόφιμο δεν είναι ασφαλές από την εμφάνισή του».

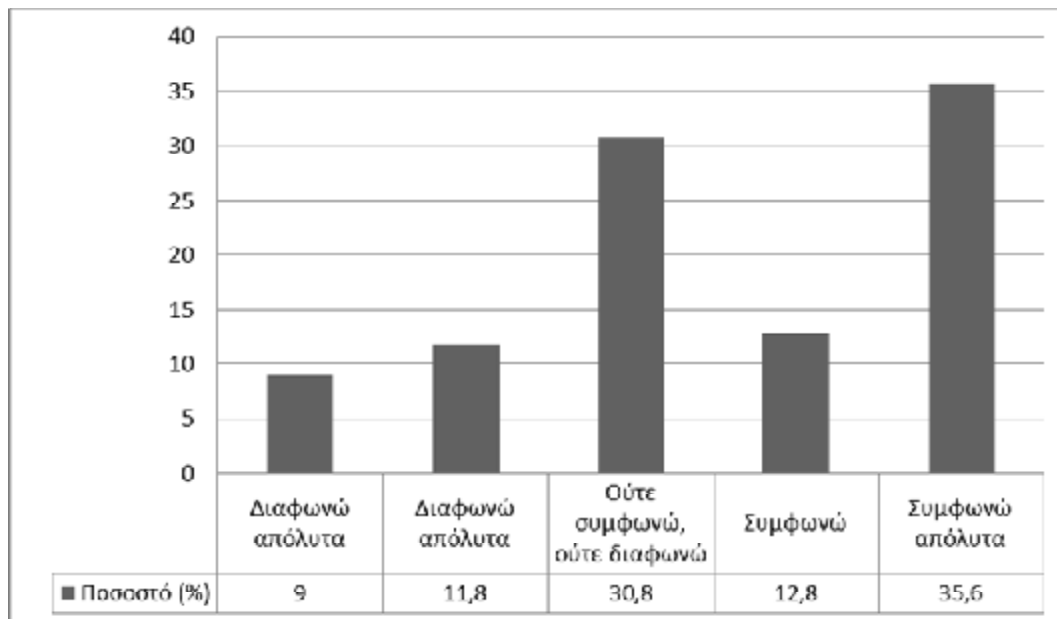


Διάγραμμα 15. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 15 «Μπορείτε να πείτε με ασφάλεια αν ένα τρόφιμο δεν είναι ασφαλές από την οσμή του.»

Εννοιολογική κατασκευή Β «Ασφάλεια επιφανειών-οικιακού εξοπλισμού»

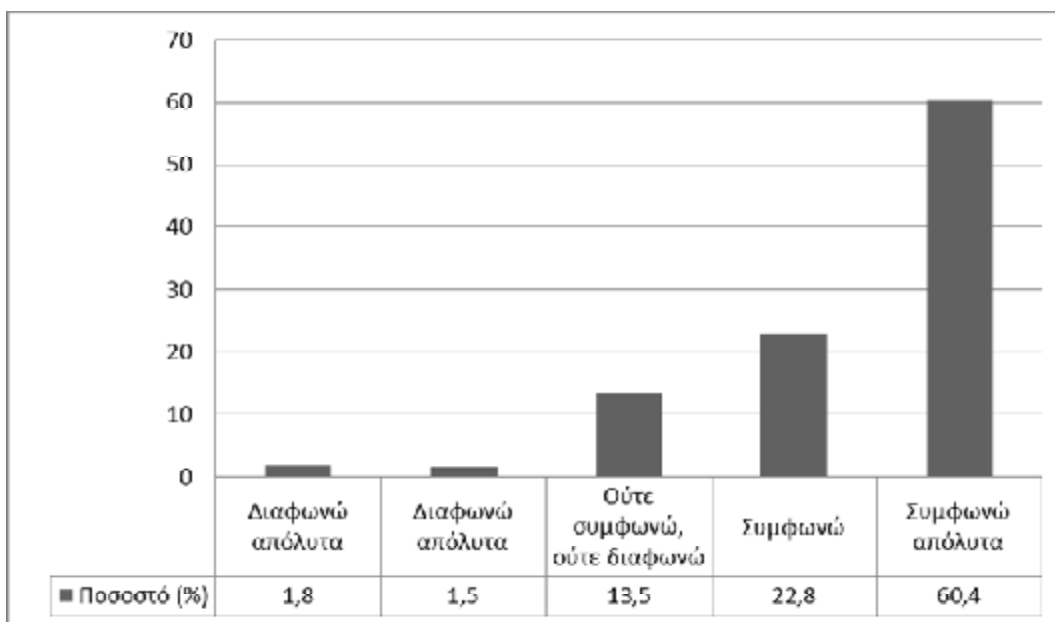
Οι μισοί ερωτηθέντες δήλωσαν ότι συμφωνούν/ συμφωνούν απόλυτα με την άποψη ότι οι πάγκοι κοπής δεν θα πρέπει να είναι ξύλινοι. Ωστόσο, μεγάλο ποσοστό (30,8 %) ούτε συμφωνεί ούτε διαφωνεί, ενώ 2 στους 10 διαφωνούν/διαφωνούν απόλυτα. Τα ποσοστά αυτά επιβεβαιώνονται

και από την ερώτηση 22, στην οποία ποσοστό 38,1 % φαίνεται να χρησιμοποιεί ξύλινο πάγκο κοπής. Οι ξύλινοι πάγκοι κοπής είναι πορώδεις, με αμυχές και σε συνδυασμό με τη δυσκολία καθαρισμού/απολύμανσής τους μπορεί να αποτελέσουν εστίες επιμόλυνσης.



Διάγραμμα 16. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 16 «Οι πάγκοι κοπής δεν θα πρέπει να είναι ξύλινοι.»

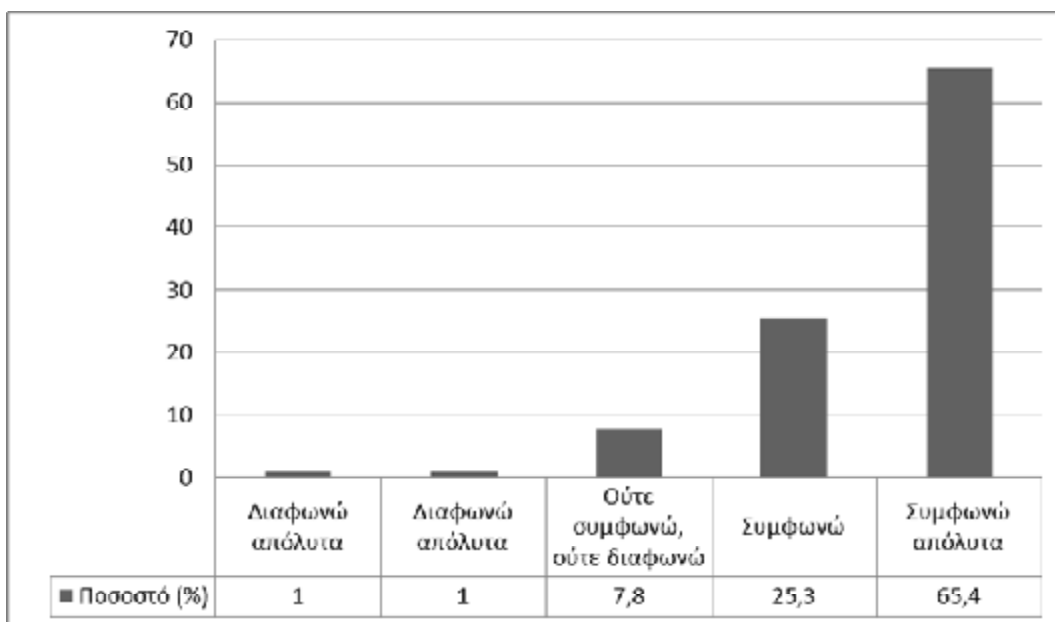
Ποσοστό 83,2 % συμφωνεί/συμφωνεί απόλυτα ότι οι πάγκοι κοπής δεν θα πρέπει να φέρουν αμυχές. Τα βακτήρια έχουν την τάση να συσσωρεύονται σε αμυχές και μη λείες επιφάνειες (Mafu et al., 1990, Stone & Zottola, 1985). Έτσι, χαραγμένες επιφάνειες και εξοπλισμός μπορούν εύκολα να επιμολυνθούν, διευκολύνοντας τον σχηματισμό βιοϋμενίων και αυξάνοντας εν συνεχεία την πιθανότητα διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Garrett et al., 2008, Rayner et al., 2004)



Διάγραμμα 17. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 17 «Είναι επικίνδυνο να χρησιμοποιούμε πάγκο κοπής που φέρει αμυχές».

Ποσοστό 90,7 % φαίνεται να αναγνωρίζει ότι οι πετσέτες και τα πανάκια της κουζίνας πιθανόν να φέρουν επικίνδυνα βακτήρια. Σε μια μελέτη, 100 πανάκια κουζίνας και σφουγγάρια συλλέχθηκαν από οικιακό περιβάλλον και υψηλός πληθυσμός βακτηρίων της τάξης των 7 log απομονώθηκε, ενώ 4 % εξ' αυτών ήταν επιμολυσμένα με τον *S. aureus* (Hilton & Austin, 2000). Τα πανάκια συχνά χρησιμοποιούνται για να σκουπίσουν επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων ή τα χέρια κι έτσι επιμολύνονται με βακτήρια και εφόσον επαναχρησιμοποιηθούν χωρίς περαιτέρω απολύμανση δρουν ως μεταφορείς των βακτηρίων ξανά πίσω στον οικιακό εξοπλισμό.

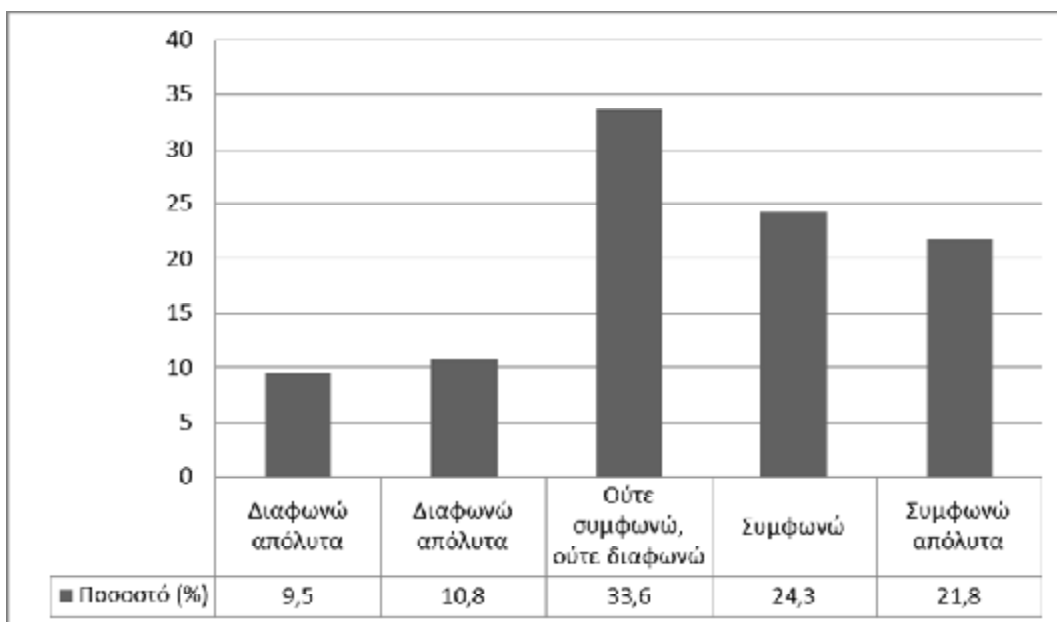
Ο ρόλος της εκπαίδευσης των καταναλωτών είναι θεμελιώδης. Το κύριο πρόβλημα ώστε να βελτιωθούν οι συνθήκες υγιεινής στην κοινότητα είναι η δυσκολία της κατανόησης από τους καταναλωτές της φύσης των βακτηρίων, των συνθηκών που ευνοούν την επιβίωση/ανάπτυξή τους και τη συσχέτιση των βακτηρίων με τους ορατούς λεκέδες και δυσάρεστη οσμή. Επίσης, σύγχυση προκαλείται από τις διαφημιστικές προσεγγίσεις που ενθαρρύνουν την άποψη ότι τα επικίνδυνα βακτήρια κυρίως σχετίζονται με ορατούς λεκέδες κι όχι με ένα φαινομενικά καθαρό υγρό πανάκι κουζίνας.



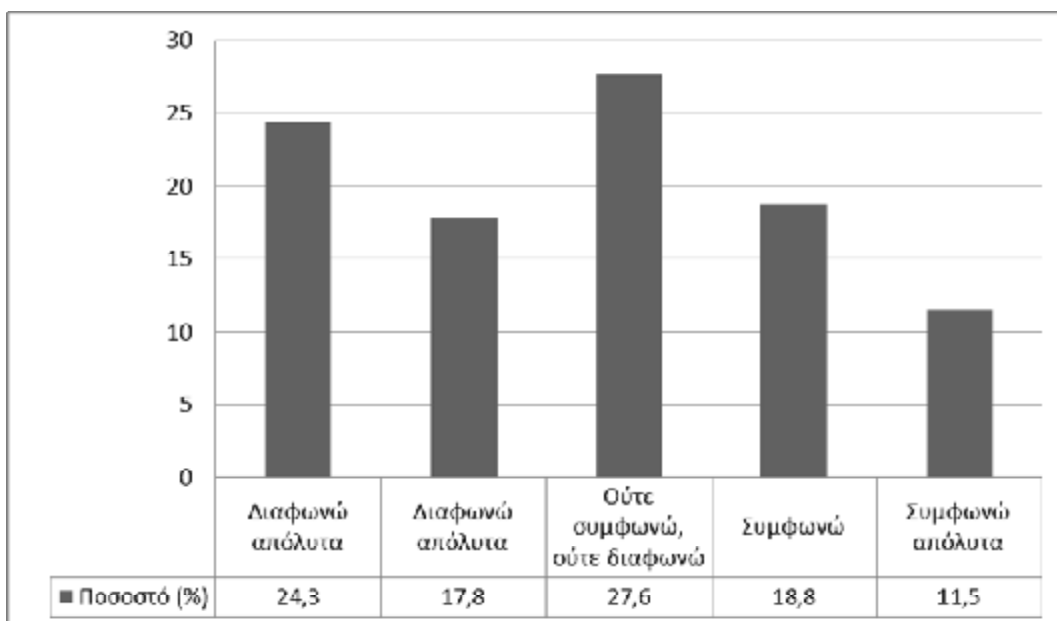
Διάγραμμα 18. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 18 «Οι πετσέτες-πανάκια της κουζίνας μπορεί να έχουν επικίνδυνα βακτήρια.»

Εννοιολογική κατασκευή Γ «Συντήρηση τροφίμων»

Από τους ισχυρισμούς 19 και 20 προκύπτει αντίστοιχα ότι το 46,1 % των ερωτηθέντων συμφωνεί στο ότι το μαγειρεμένο φαγητό θα πρέπει να τοποθετείται στο ψυγείο σε 2 h και το 42,1 % επαληθεύει ότι δεν είναι ασφαλές το φαγητό που περισσεύει να μείνει στον πάγκο για μερικές ώρες. Σε μια μελέτη που διεξήχθη στη Μ. Βρετανία, το 35 % ανέφερε ότι αφήνει τα υπολείμματα από μαγειρεμένο κοτόπουλο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2-4 h (Beddows, 1983). Ωστόσο, παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά αβεβαιότητας σχετικά με την ορθή πρακτική σε σχέση με την άμεση ψύξη των τροφίμων. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στη λανθασμένη άποψη ότι το μαγειρεμένο φαγητό θα πρέπει να φέρεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν ψυχθεί ή καταψυχθεί. Όντως, σε έρευνες που διεξήχθησαν στις Η.Π.Α, 50 % των ερωτηθέντων φάνηκε να υιοθετούν την παραπάνω λανθασμένη γνώμη (Bruhn & Schutz, 1999) και το 45 % πίστευαν εσφαλμένα ότι τα υπολείμματα τροφίμων μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μετά από θέρμανση (Albrecht, 1995).



Διάγραμμα 19. Απαντήσεις στο ισχυρισμό 19 «Το μαγειρεμένο φαγητό θα πρέπει να τοποθετείται στο ψυγείο σε 2 h.»

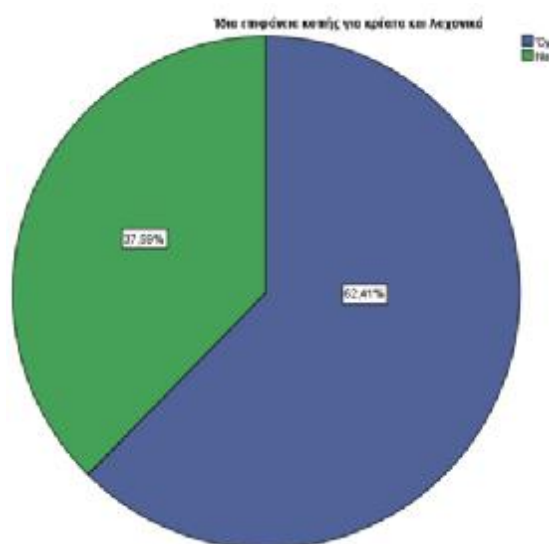


Διάγραμμα 20. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 20 «Δεν είναι ασφαλές το φαγητό που περισσεύει να μείνει στον πάγκο για μερικές ώρες.»

Εννοιολογική κατασκευή Δ «Διασταυρούμενη επιμόλυνση»

Ποσοστό 35,6 % των καταναλωτών χρησιμοποιούν την ίδια επιφάνεια κοπής για

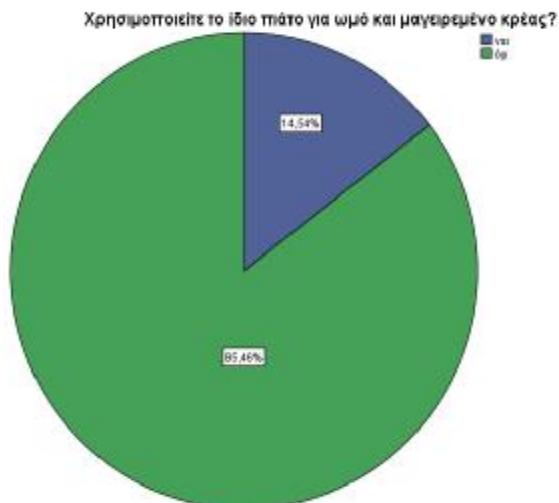
κρέατα και λαχανικά, ενώ το 62,41 % διαφορετική. Σε μελέτη ερωτηματολογίου σε 56 οικίες, 45 % των καταναλωτών δήλωσαν ότι δεν χρησιμοποιούσαν διαφορετική επιφάνεια κοπής για ωμό κοτόπουλο και άλλα τρόφιμα (Mazengia et al., 2015). Ποσοστό 80 % των ερωτηθέντων ισχυρίστηκαν ότι πάντα χρησιμοποιούν διαφορετικά ή πλυμμένα εργαλεία κατά το χειρισμό ωμών και έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων (Griffith et al., 1999). Σε μια μελέτη παρατήρησης στις Η.Π.Α. ποσοστό 84 % των φαινομένων διασταυρούμενης επιμόλυνσης αφορούσαν μεταφορά από πιθανόν επιμολυσμένο ωμό κρέας ή αυγά σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Anderson et al., 2004). Σε αντίστοιχη έρευνα πεδίου στην Αυστραλία, περίπου 30 % απέτυχε να καθαρίσει την επιφάνεια κοπής πριν την προετοιμασία έτοιμου προς κατανάλωση τροφίμου (Jay et al., 1999).



Διάγραμμα 21. Απαντήσεις στο ερώτημα 23 «Χρησιμοποιείτε την ίδια επιφάνεια κοπής για κρέατα και λαχανικά;»

Η καμπάνια Fight Bac! συστήνει να μην τοποθετείται ποτέ μαγειρεμένο τρόφιμο σε πιάτο όπου προηγουμένως επεξεργάστηκε ωμό κρέας, πουλερικά ή θαλασσινά. Η συντριπτική πλειοψηφία των ερωτηθέντων (85,5 %) δεν χρησιμοποιεί ποτέ το ίδιο πιάτο για ωμό και μαγειρεμένο κρέας. Ωστόσο, μη αμελητέο ποσοστό της τάξης του 14,54 % δήλωσε ότι εφαρμόζει αυτή πρακτική. Σε μια μελέτη βιντεοσκόπησης, κανένας από τους καταναλωτές δεν σέρβιρε το μαγειρεμένο τρόφιμο στο ίδιο πιάτο στο οποίο πρωθύστερα είχε το ωμό κρέας (Anderson et al., 2004). Ποσοστό που κυμαινόταν από 59-76 % δήλωσε ότι πάντα ή συχνά χρησιμοποιούσε διαφορετικά εργαλεία και επιφάνειες κοπής για ωμό και μαγειρεμένο φαγητό, σε δυο μελέτες στη Μ. Βρετανία και μια Ευρωπαϊκή (DHSS & NIHSSB, 1998, FDF, 1996, FSAI, 1998). Ποσοστό 77-80 % είπαν ότι ποτέ δεν θα χρησιμοποιούσαν το ίδιο πιάτο για ωμό και μαγειρεμένο κρέας σε δυο μελέτες στις Η.Π.Α. (ADAF, 1999, Bruhn & Schutz, 1999), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στην

Κωνσταντινούπολη ήταν στο 88,6 % (Aygen, 2012).



Διάγραμμα 22. Απαντήσεις στο ερώτημα 25 «Χρησιμοποιείτε το ίδιο πιάτο για ωμό και μαγειρεμένο κρέας;»

Ερωτήσεις αυτό-αναφερόμενων πρακτικών

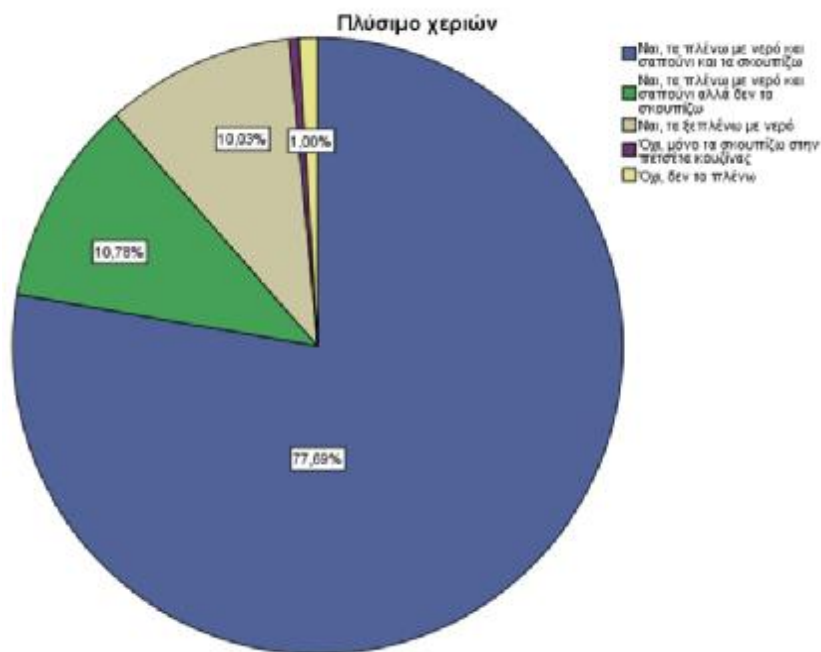
Διερεύνηση προσωπική υγιεινής

Ο ρόλος των χεριών στη μετάδοση ασθενειών και η σημασία της υγιεινής των χεριών στην πρόληψη των τροφιμογενών λοιμώξεων είναι αποδεδειγμένη από διάφορες μελέτες (Guzewich & Ross, 1999, Larson, 1988, Michaels et al., 2001, Teare, 1999). Η πλειοψηφία των καταναλωτών (75 έως 100 %) επίσης φαίνεται να την αναγνωρίζει ως απαραίτητη πρακτική που διασφαλίζει την υγιεινή των τροφίμων (Altekruse et al., 1996, Griffith et al., 2001, Jay et al., 1999, Lader, 1999). Σε ένα ερωτηματολόγιο που διεξήχθη στην Τουρκία ποσοστό 31 % δήλωσε ότι το πλύσιμο των χεριών είναι απαραίτητο ώστε αυτά να είναι καθαρά και το 66,6 % πιστεύει ότι είναι σημαντικό για να απαλλαγθεί από τα μικρόβια (Unusan et al., 2007). Το πλύσιμο των χεριών έχει αναγνωριστεί ως ένας παράγοντας υπεύθυνος για τη πρόληψη της διασποράς μικροοργανισμών και η ανεπαρκής εφαρμογή του μπορεί να οδηγήσει σε τροφιμογενείς λοιμώξεις.

Η καμπάνια Fight Bac! συστήνει πλύσιμο των χεριών πριν την προετοιμασία του φαγητού και για καλύτερα αποτελέσματα συστήνεται η χρήση ζεστού νερού με σαπούνι και τρίψιμο των χεριών για τουλάχιστον 20 sec (PFSE, 2001). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το 77,7 % των καταναλωτών δήλωσε τη σωστή συμπεριφορά ως προς το πλύσιμο των χεριών. Το στέγνωμα των χεριών είναι ένα κρίσιμο σημείο στη διαδικασία καθαρισμού των χεριών και πρέπει να γίνεται με

τρόπο ώστε να μειώνει τον κίνδυνο διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Harrison et al., 2003). Αυτό απαιτεί αποτελεσματικό στέγνωμα και την προϋπόθεση ότι δεν λαμβάνει χώρα εκ νέου επιμόλυνση των χεριών. Στη μελέτη, ποσοστό 10,8 % δήλωσε ότι ενώ πλένει τα χέρια του με τον ενδεδειγμένο τρόπο δεν τα στεγνώνει. Οι υπόλοιποι καταναλωτές (11,5 %) δήλωσαν ανεπαρκή τρόπο καθαρισμού των χεριών, γεγονός που πιθανόν να οδηγήσει στη διασπορά παθογόνων μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια προετοιμασίας γευμάτων.

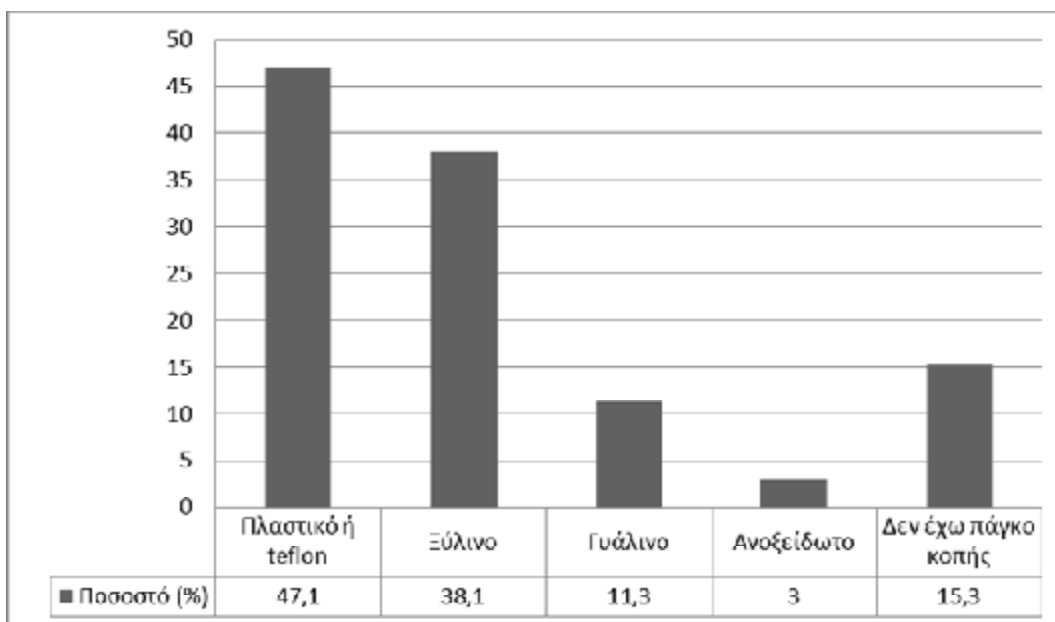
Το πλύσιμο των χεριών έχει αναγνωριστεί ως ένας απλός και αποτελεσματικός τρόπος για της μείωση της επικινδυνότητας λοίμωξεων, κυρίως μέσω της μείωσης της διασταυρούμενης επιμόλυνσης και της μετάδοσης τροφιμογενών παθογόνων (Ali et al., 2014, de Jong et al., 2008, Ede & Hanhe, 1990). Μια ανάλυση των μελετών σχετικά με το πλύσιμο χεριών έδειξε ότι περίπου το 1/3 των καταναλωτών δεν είναι εξοικειωμένοι με τις διαδικασίες πλυσίματος και στεγνώματος των χεριών. Ποσοστό 87-92 % δήλωσε ότι πλένει τα χέρια του με νερό και σαπούνι πριν την προετοιμασία γεύματος σε τρεις μελέτες ερωτηματολογίου (DHSC & NISSSB, 1998, FDF, 1996, FSAI, 1998). Σε μια επιτόπια έρευνα κατά τη διάρκεια προετοιμασίας γεύματος σε οικιακές κουζίνες ποσοστό 65,65 % των ερωτηθέντων έπλυναν τα χέρια με την ορθή πρακτική, 32,32 % έπλυναν τα χέρια μόνο με νερό και 0,02 % δεν έπλυναν καθόλου τα χέρια τους (Anderson et al., 2004). Σε μια άλλη έρευνα όπου καταναλωτές ζητήθηκαν να προετοιμάσουν σαλάτα με κοτόπουλο και φρούτα, 64 % των συμμετεχόντων δεν χρησιμοποίησαν σαπούνι κατά το πλύσιμο των χεριών και μόνο ποσοστό το 14 % έπλυνε τα χέρια του με την ενδεδειγμένη μέθοδο.



Διάγραμμα 23. Απαντήσεις στην ερώτηση 21 «Πλένετε τα χέρια σας πριν και κατά τη διάρκεια προετοιμασίας φαγητού;»

Διερεύνηση διαχωρισμού (διασταυρούμενης- επιμόλυνσης)

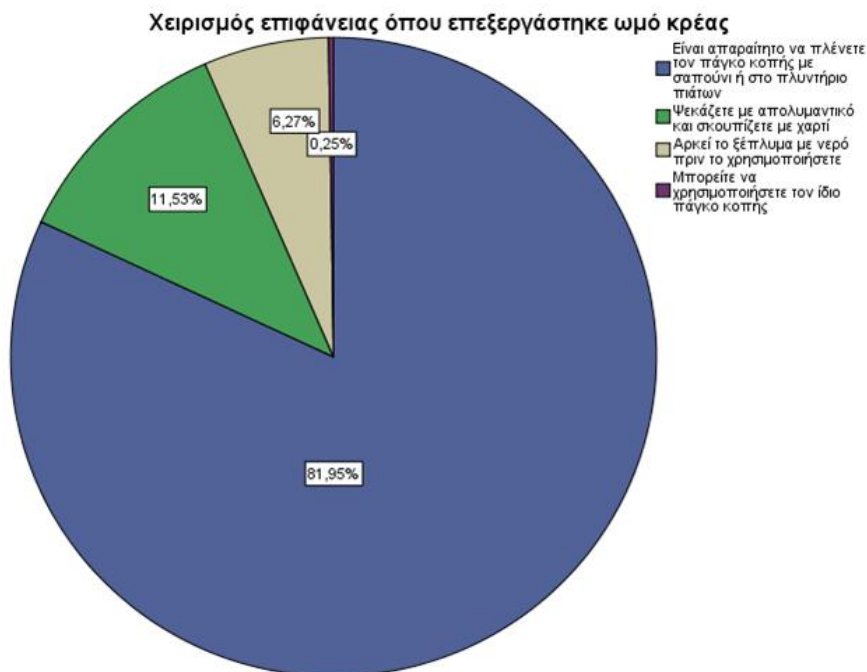
Το είδος του υλικού της επιφάνειας επεξεργασίας τροφίμων είναι κρίσιμος παράγοντας όταν υπάρχει η πιθανότητα χειρισμού ωμών τροφίμων επιμολυσμένων με τροφιμογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς. Σχετικά με τις επιφάνειες που χρησιμοποιούν οι καταναλωτές για την επεξεργασία των τροφίμων τους, 47,1 % εξ αυτών έχουν πλαστικό πάγκο κοπής, 38,1 % ξύλινο, 11,3 % γυάλινο, 3 % ανοξείδωτο πάγκο χειρισμού τροφίμων, ενώ ποσοστό 15,3 % δεν έχει πάγκο κοπής.



Διάγραμμα 24. Απαντήσεις στο ερώτημα 22 «Τι είδους πάγκο κοπής χρησιμοποιείτε (πολλαπλής επιλογής);»

Σύμφωνα με τις συστάσεις του Fight Bac! πάγκοι κοπής, μαχαίρια και άλλα εργαλεία που έρχονται σε επαφή με ωμό κρέας, πουλερικά και θαλασσινά θα πρέπει να πλένονται πάντα με νερό και σαπούνι πριν επαναχρησιμοποιηθούν (PFSE, 2001). Ποσοστό 82 % ισχυρίζεται ότι πλένει τον πάγκο κοπής με νερό και σαπούνι ή στο πλυντήριο πιάτων όταν χειριστεί ωμό κρέας και πριν επεξεργαστεί έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, 11,6 % ψεκάζει την επιφάνεια με απολυμαντικό και σκουπίζει με χαρτί ενώ 6,3 % ξεπλένει τον πάγκο μόνο με νερό. Ποσοστό 0,3 % χρησιμοποιεί τον ίδιο πάγκο κοπής. Σε δύο έρευνες καταναλωτών στις Η.Π.Α. ποσοστό 19-20 % δήλωσε ότι δεν πλένει τις επιφάνειες κοπής με σαπούνι μετά το χειρισμό ωμού κρέατος ή κοτόπουλου (Altekruse et

al., 1996, Yang et al., 1998). Ωστόσο, το ποσοστό ανεπαρκούς καθαρισμού των επιφανειών που έχουν έρθει σε επαφή με ωμό κρέας διαφέρει σημαντικά στις μελέτες παρατήρησης των καταναλωτών και κυμαίνεται από 30 έως 91 % (Jay et al., 1999, Redmond et al., 2002, Worsfold & Griffith, 1997). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι ποσοστό 83-90 % των καταναλωτών δεν χρησιμοποιούν διαφορετικές περιοχές της κουζίνας για την προετοιμασία ωμού και μαγειρεμένου τροφίμου αυξάνει την επικινδυνότητα (Griffith et al., 1999, Worsfold & Griffith, 1997).



Διάγραμμα 25. Απαντήσεις στο ερώτημα 24 «Σε περίπτωση που κόψετε σε ένα πάγκο κοπής ωμό κρέας και πριν χειριστείτε άλλα τρόφιμα που θα καταναλωθούν ωμά...»

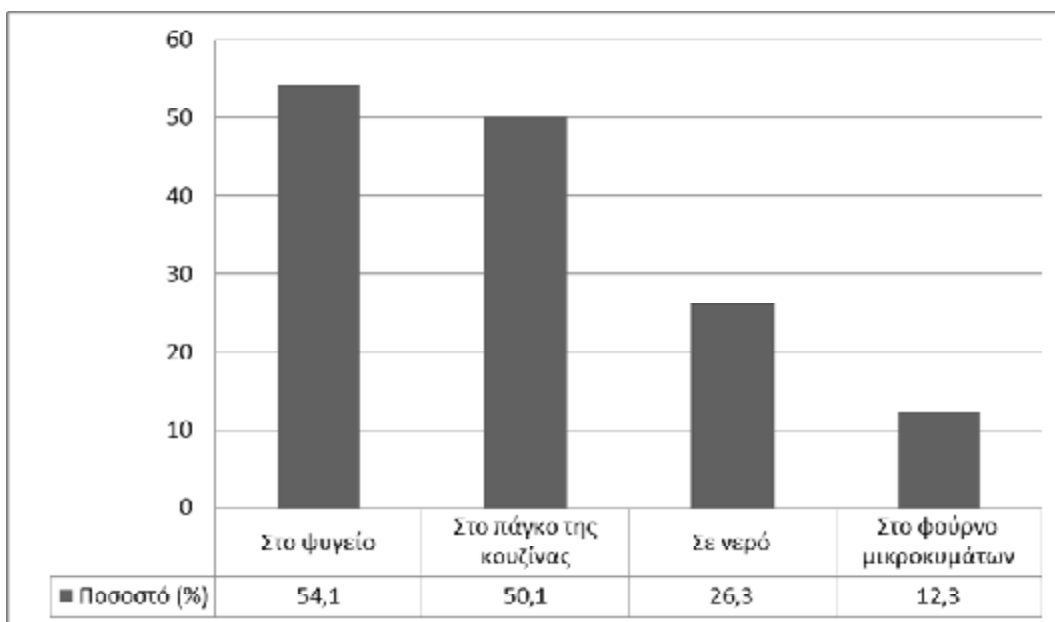
Διερεύνηση διατήρησης αλυσίδας ψύχους

Όσον αφορά την ερώτηση για την απόψυξη των τροφίμων, δόθηκε η δυνατότητα στους ερωτηθέντες να επιλέξουν περισσότερους του ενός τρόπους, ώστε να μην εξαναγκαστεί σε μια συγκεκριμένη απάντηση κι έτσι σύμφωνα με τα αποτελέσματα 54,1 % εκ των απαντήσεων ήταν υπό ψύξη και 50,1 % στον πάγκο της κουζίνας. Ποσοστό 26,3 % επέλεξε ως μέθοδο απόψυξης την εμβάπτιση σε νερό και 12,3 % στο φούρνο μικροκυμάτων. Η USDA/FSIS (2010b) έχει εκδώσει γενικές οδηγίες σχετικά με τις ενδεικνυόμενες πρακτικές απόψυξης που θα πρέπει να ακολουθούν οι καταναλωτές. Σύμφωνα με τις συστάσεις αυτές, τα τρόφιμα θα πρέπει να αποψύχονται υπό ψύξη στους 4 °C ή σε κρύο νερό, ενώ ο φούρνος μικροκυμάτων επιτρέπεται μόνο όταν το προϊόν καταναλώνεται άμεσα μετά την απόψυξη. Αντιθέτως, η απόψυξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή

σε ζεστό νερό δεν συστήνεται, καθώς το τρόφιμο εκτίθεται στην «επικίνδυνη ζώνη», 4,4-60 °C όπου τα βακτήρια αναπτύσσονται με ταχείς ρυθμούς. Όντως, κατά την απόψυξη στον πάγκο της κουζίνας το τρόφιμο φτάνει από τους -27 °C στους 0 °C σε 2 h (Lianou & Koutsoumanis, 2009), που αποτελεί τον ανώτατο χρόνο παραμονής του κιμά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σύμφωνα με τις συστάσεις του USDA-FSIS (USDA- FSFIS, 2012).

Η πλειοψηφία των καταναλωτών δεν ακολουθούν αυτές τις οδηγίες καθώς έρχονται σε αντίθεση με την προσωπική τους άνεση αλλά και λόγω ανεπάρκειας διάθεσης χρόνου. Όντως, σε μια μελέτη καταγράφηκε ότι παρόλο που αρκετοί συμμετέχοντες γνώριζαν ότι η καλύτερη μέθοδος απόψυξης είναι στο ψυγείο, ήταν προφανές ότι οι περισσότεροι θα συνέχιζαν να αποψύχουν, τουλάχιστον εν μέρει, στον πάγκο της κουζίνας, καθώς η απόψυξη στο ψυγείο απαιτεί προγραμματισμό και πρόβλεψη από μέρους τους (Patterson, 2007). Αυτό το συμπέρασμα εξάγεται και από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, καθώς οι καταναλωτές φάνηκε να επιλέγουν σε παρόμοιο ποσοστό τις δύο πιο κοινές μεθόδους απόψυξης, δηλαδή υπό ψύξη και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Αρκετές μελέτες έχουν ερευνήσει τις μεθόδους απόψυξης που επιλέγουν οι καταναλωτές (Gilbert et al., 2007a, Gong et al., 2011, Jay et al., 1999, Jevnik et al., 2008, Karabudak et al., 2008, Kennedy et al., 2005, Meer & Misner, 2000, Nesbitt et al., 2009, Phang & Bruhn, 2011, Surujlal & Badrie, 2003, Trepka et al., 2007) και διαφορές παρατηρούνται ανάλογα με την χώρα διεξαγωγής της μελέτης (Manios, 2012). Ενδεικτικά, σε μελέτη που διεξήχθη στον Καναδά 51 % των καταναλωτών αποψύχουν κρέας στο ψυγείο, 31 % στο φούρνο μικροκυμάτων, 26 % σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 8 % σε νερό και <1 % το μαγειρεύουν χωρίς απόψυξη (Nesbitt et al., 2009). Εν αντιθέσει, στην Κίνα, μόνο το 7 % αποψύχει τα τρόφιμα υπό ψύξη, 30,9 % σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 23,8 % σε κρύο και 16,6 % σε ζεστό νερό (Gong et al., 2011). Οι Phang και Bruhn (2011) ανέφεραν ότι το 16 % των καταναλωτών ξεπαγώνουν το ωμό κρέας στον πάγκο της κουζίνας και το 56 % υπό ψύξη. Στην Τουρκία, 14,7 % των καταναλωτών επιλέγουν ως μέθοδο απόψυξης το ψυγείο, ενώ σε ποσοστό 66,9 % αποψύχουν τα τρόφιμα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Karabudak et al., 2008).



Διάγραμμα 26. Απαντήσεις στο ερώτημα 27 «Που τοποθετείτε τα κατεψυγμένα τρόφιμα για να ξεπαγώσουν (πολλαπλής επιλογής);»

Συγκρίσεις μεταξύ ερωτήσεων

Σύγκριση της πιθανότητας τροφιμογενούς λοίμωξης με δημογραφικά στοιχεία

Παρατηρείται αυξημένη συχνότητα σε σχέση με την αναμενόμενη, στην περίπτωση της ομάδας των φοιτητών που είχαν τροφική λοίμωξη τους τελευταίους 12 μήνες. Ωστόσο, σύμφωνα με το chi-square test είναι ανεξάρτητες, δηλαδή η επαγγελματική κατάσταση δεν φαίνεται να επηρεάζει τη συχνότητα εμφάνισης τροφολοίμωξης. Το μορφωτικό επίπεδο (ανώτατο επίπεδο εκπαίδευσης που έχει συμπληρωθεί) δεν φαίνεται να επηρεάζει την πιθανότητα τροφολοίμωξης. Όταν δεν υπάρχουν ηλικιωμένοι στην οικογένεια παρατηρείται μειωμένη συχνότητα τροφολοίμωξης σε σχέση με το αναμενόμενο. Ενώ όταν υπάρχουν ηλικιωμένοι, παρατηρείται αυξημένη συχνότητα τροφολοίμωξης σε σχέση με το αναμενόμενο. Οι μεταβλητές «υπάρχουν ηλικιωμένοι > 60 ετών» και «ύπαρξη τροφιμογενούς λοίμωξης τους τελευταίους 12 μήνες» ήταν εξαρτημένες. Οι καταναλωτές <29 ετών παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα τροφολοίμωξης από την αναμενόμενη. Ωστόσο σύμφωνα με το τεστ X² η ηλικία δεν φαίνεται να επηρεάζει την πιθανότητα εμφάνισης τροφολοίμωξης. Οι άνδρες και οι γυναίκες έχουν την ίδια συχνότητα εμφάνισης τροφολοίμωξης στο τελευταίο 12μηνο.

Συγκρίσεις μεταξύ εννοιολογικών κατασκευών

Οι εννοιολογικές κατασκευές (constructs) δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή.

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Συσχέτιση τροφίμων-μικροοργανισμών	,086	399	,000	,971	399	,000
Ασφάλεια επιφανειών-οικιακού εξοπλισμού	,142	399	,000	,910	399	,000
Συντήρηση τροφίμων	,131	399	,000	,957	399	,000
Διασταυρούμενη επιμόλυνση	,354	399	,000	,719	399	,000

a. Lilliefors Significance Correction

Επομένως, για τη διεξαγωγή της διαδικασίας ανάλυσης συσχέτισης δεν χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson, αλλά ο αντίστοιχος του Spearman. Είναι συντελεστής γραμμικής συσχέτισης, συμβολίζεται με r και παίρνει τιμές από -1 έως 1 ($-1 \leq \rho \leq 1$).

- -1 έως $-0,5$: θεωρούμε ότι είναι υψηλός αρνητικός συντελεστής συσχέτισης
- $-0,5$ έως $-0,2$: θεωρούμε ότι είναι χαμηλός αρνητικός συντελεστής συσχέτισης
- $-0,2$ έως $0,2$: θεωρούμε ότι ο συντελεστής συσχέτισης είναι μηδενικός
- $0,2$ έως $0,5$: θεωρούμε ότι είναι χαμηλός θετικός συντελεστής συσχέτισης
- $0,5$ έως 1 : θεωρούμε ότι είναι υψηλός θετικός συντελεστής συσχέτισης

Correlations

			Συσχέτιση τροφίμων-μικροοργανισμών	Ασφάλεια επιφανειών-οικιακού εξοπλισμού	Συντήρηση τροφίμων	Διασταυρούμενη επιμόλυνση
Spearman's rho	Συσχέτιση τροφίμων-μικροοργανισμών	Correlation Coefficient	1,000	,133**	,217**	,039
		Sig. (2-tailed)	.	,008	,000	,438
		N	399	399	399	399
	Ασφάλεια επιφανειών-οικιακού εξοπλισμού	Correlation Coefficient	,133**	1,000	,137**	,163**
		Sig. (2-tailed)	,008	.	,006	,001
		N	399	399	399	399
	Συντήρηση τροφίμων	Correlation Coefficient	,217**	,137**	1,000	,041
		Sig. (2-tailed)	,000	,006	.	,413
		N	399	399	399	399
	Διασταυρούμενη επιμόλυνση	Correlation Coefficient	,039	,163**	,041	1,000
		Sig. (2-tailed)	,438	,001	,413	.
		N	399	399	399	399

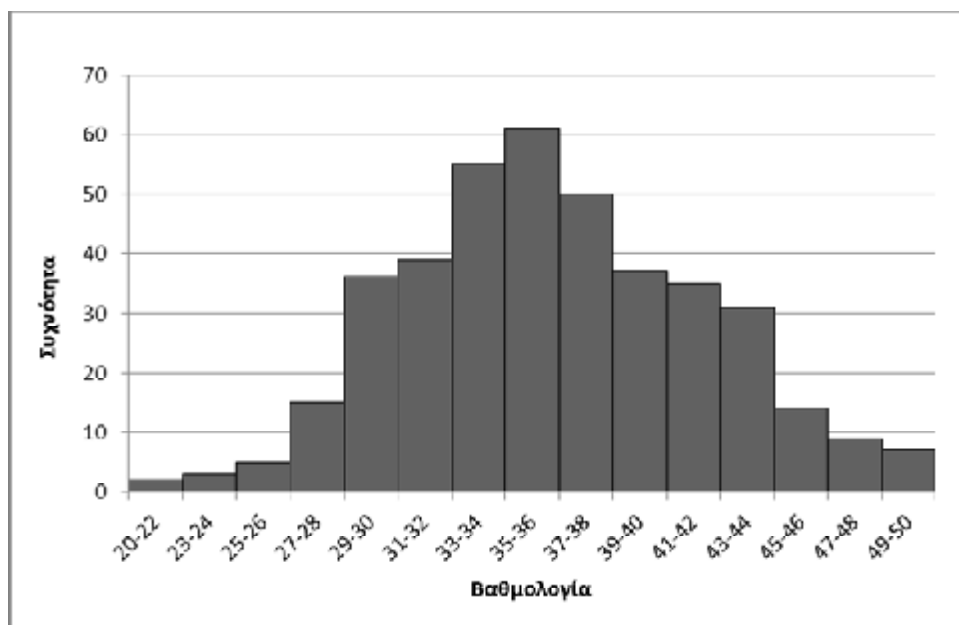
** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Ανάμεσα στις «γνώσεις συσχέτισης τροφίμων-μικροοργανισμών» και «γνώσεις συντήρησης τροφίμων» υπάρχει θετικός χαμηλός₁₀₁ συντελεστής συσχέτισης ($\rho = 0,217$) και

στατιστικά σημαντικός σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01. Ανάμεσα στις «γνώσεις συσχέτισης τροφίμων-μικροοργανισμών» και «γνώσεις ασφάλειας επιφανειών-οικιακού εξοπλισμού» υπάρχει μηδενικός συντελεστής συσχέτισης ($\rho = 0,133$) και στατιστικά σημαντικός σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01. Ανάμεσα στις «πρακτικές διασταυρούμενης επιμόλυνσης» και «γνώσεις ασφάλειας επιφανειών-οικιακού εξοπλισμού» υπάρχει μηδενικός συντελεστής συσχέτισης ($\rho = 0,163$) και στατιστικά σημαντικός σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01. Ανάμεσα στις «πρακτικές διασταυρούμενης επιμόλυνσης» και «γνώσεις συντήρησης τροφίμων» υπάρχει μηδενικός συντελεστής συσχέτισης ($\rho = 0,137$) και στατιστικά σημαντικός σε επίπεδο σημαντικότητας 0,01.

Συνολική βαθμολογία

Ο βαθμός που συγκέντρωσε ο κάθε ερωτώμενος σε σχέση με την κάθε εννοιολογική κατασκευή και τις μεταβλητές αθροίστηκε και αποτέλεσε τη συνολική βαθμολογία του. Συγκεκριμένα καταγράφηκαν εννέα ερωτήσεις με βαθμολογία (1-5) και δύο ερωτήσεις με βαθμολογία (1-2). Άρα η ελάχιστη βαθμολογία ήταν 11 και η μέγιστη 49. Όπως παρατηρείται στον παρακάτω πίνακα, η βαθμολογία των καταναλωτών κυμάνθηκε σε εύρος 22-49, με μέσο όρο \pm τυπική απόκλιση $36,29 \pm 5,48$ (**Διάγραμμα 27**).

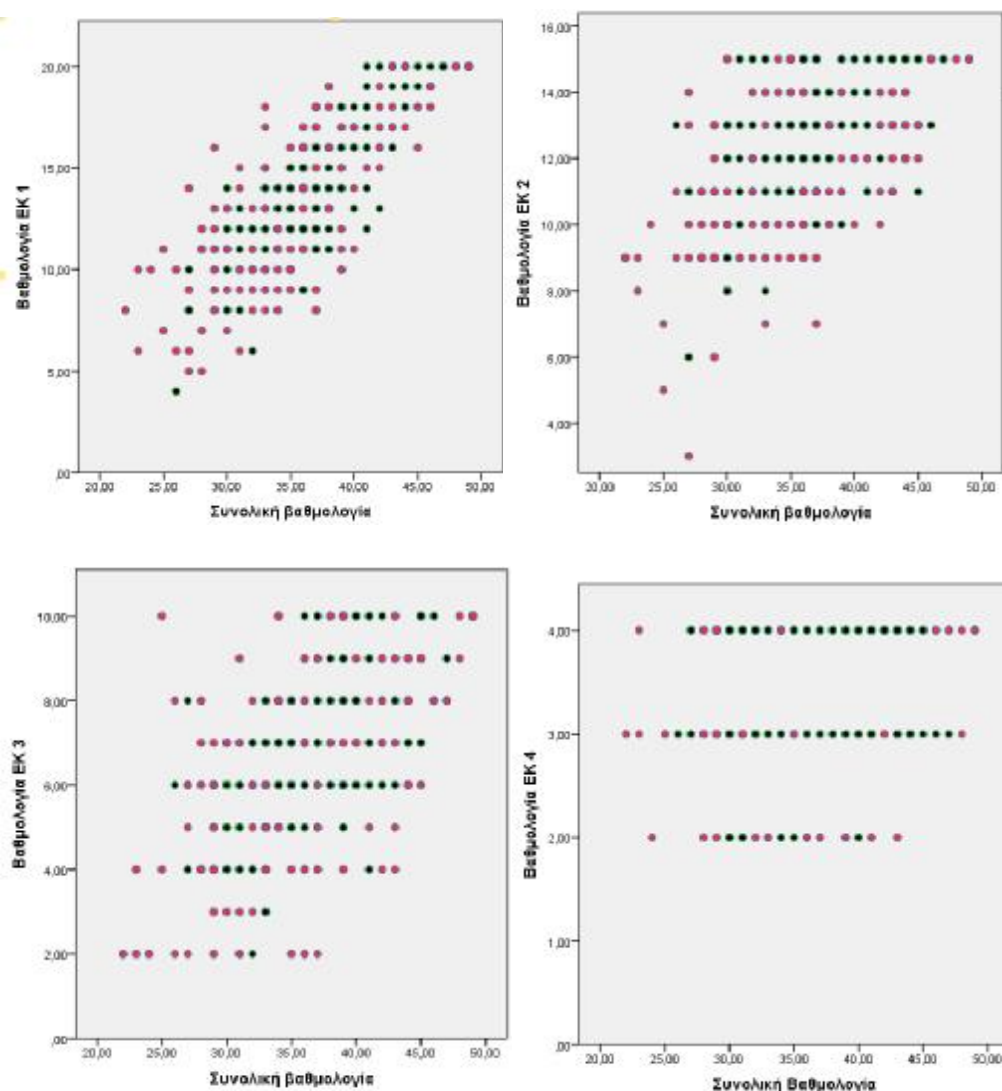


Διάγραμμα 27. Ιστόγραμμα συχνοτήτων που αφορά τη συνολική βαθμολογία που συγκέντρωσαν οι καταναλωτές και προέκυψε από τη καταγραφή εννέα ερωτήσεων με βαθμολογία (1-5) και δύο ερωτήσεων με βαθμολογία (1-2)

Το μορφωτικό επίπεδο φάνηκε να επηρεάζει τις γνώσεις και τις πρακτικές

ασφαλούς χειρισμού των τροφίμων. Συγκεκριμένα, η βαθμολογία που συγκέντρωσαν οι καταναλωτές ήταν με αύξουσα σειρά απόφοιτος γυμνασίου/λυκείου, απόφοιτος ανώτατης εκπαίδευσης και κάτοχος μεταπτυχιακού διδακτορικού. Η μόρφωση έχει βρεθεί επίσης να επηρεάζει τον τρόπο χειρισμού τροφίμων με τους καταναλωτές που διαθέτουν μεσαίου επιπέδου μόρφωση (απολυτήριο λυκείου) να υιοθετούν πιο ασφαλείς πρακτικές (Zhang et al., 2010, Li-Cohen & Bruhn, 2002).

Η βαθμολογία που συγκέντρωσαν οι ερωτηθέντες δεν διαφοροποιήθηκε ούτε με το φύλο, ούτε με την ηλικία, ούτε με το αν είχαν τροφολοιμώξη τους τελευταίους 12 μήνες (**Διάγραμμα 28**). Αντίθετως, μελέτες προηγούμενων ετών έχουν δείξει τις γυναίκες ως πιο ασφαλείς στο χειρισμό τροφίμων σε σύγκριση με τους άνδρες (Altekruse et al., 1999, Angelillo et al., 2001, Li-Cohen & Bruhn, 2002).



Διάγραμμα 28. Scatter plot διάγραμμα που αφορά την βαθμολογία από τις απαντήσεις των εννοιολογικών

κατασκευών 1 (πάνω αριστερά), 2 (πάνω δεξιά), 3 (κάτω αριστερά), 4 (κάτω δεξιά) σε συνάρτηση με τη συνολική βαθμολογία των καταναλωτών και ως προς την εμφάνιση τροφολοίμωξης τελευταίους 12 μήνες (ναι= κόκκινες βούλες, όχι= μαύρες βούλες)

Το γεγονός ότι οι άνδρες έχουν βρεθεί σε πρόσφατες μελέτες να εμπλέκονται σε μεγαλύτερο βαθμό με το χειρισμό και την προετοιμασία στο σπίτι σε σύγκριση με τις προηγούμενες δεκαετίες πιθανόν να επεξηγεί την υιοθέτηση καλύτερων πρακτικών από μέρους των ανδρών (Knight et al., 2003, Unusan et al., 2007). Ωστόσο, η επαγγελματική κατάσταση φαίνεται να επηρεάζει τον τρόπο που απάντησαν οι καταναλωτές, καθώς οι εργαζόμενοι με οικιακά είχαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη βαθμολογία σε σχέση με τους δημοσίους υπαλλήλους, ελεύθερους επαγγελματίες και φοιτητές. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, καθώς ένας πληθυσμός ατόμων που ασχολείται με την προετοιμασία τροφίμων φαίνεται να μειονεκτεί ως προς τις γνώσεις και τις πρακτικές ασφαλούς χειρισμού τροφίμων.

Συμπεράσματα

Μια προηγούμενη μελέτη που αφορούσε μέλη κράτη της Ε.Ε. έδειξε ότι η προληπτική προστασία των καταναλωτών είχε ισχυρό αντίκτυπο στις αξιολογήσεις των καταναλωτών για τη διαχείριση των κινδύνων των τροφίμων στην Ελλάδα (van Kleef et al., 2007). Έτσι, η πρόληψη των τροφιμογενών λοιμώξεων εξαρτάται άμεσα από την ανίχνευση λανθασμένων συμπεριφορών των καταναλωτών με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη κατάλληλων στρατηγικών για την μείωση του κινδύνου (Fischer et al., 2005). Αυτή η μελέτη κατέδειξε ορισμένα κενά ως προς τις γνώσεις και τις πρακτικές που αφορούν τον χειρισμό των τροφίμων. Οι καταναλωτές στην Ελλάδα δεν ήταν εξοικειωμένοι με τη διατήρηση των τροφίμων σε ασφαλή θερμοκρασία (π.χ. απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου) και την πρόληψη φαινομένων διασταυρούμενης επιμόλυνσης (π.χ. ίδια επιφάνεια κοπής για τρόφιμα ζωικής και φυτικής προέλευσης), υπογραμμίζοντας την ανάγκη για την περαιτέρω εκπαίδευση των καταναλωτών όσον αφορά τις πρακτικές ασφαλούς χειρισμού τροφίμων στο οικιακό περιβάλλον. Αυτά τα εκπαιδευτικά προγράμματα θα πρέπει να αναφέρονται σε ομάδες-στόχους που βρέθηκαν να είναι σε μειονεκτική θέση ως προς τις γνώσεις τους για την ασφάλεια των τροφίμων (π.χ. νοικοκυρές). Επίσης, θα πρέπει να προσαρμόζονται στις ιδιαίτερες ανάγκες και τις ελλείψεις της κάθε χώρας. Συγκεκριμένα, μέσω της αξιολόγησης του ποσοστού των καταναλωτών που είχαν συμπτώματα τροφιμογενούς λοίμωξης τους τελευταίους 12 μήνες, προσδιορίστηκαν οι ομάδες που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο (π.χ. φοιτητές, μέλος της οικογένειας > 60 ετών).

Η ευθύνη των καταναλωτών είναι σημαντική, καθώς είναι υπεύθυνοι για την προετοιμασία

των τροφίμων που θα καταναλώσουν, τόσο οι ίδιοι όσο και άλλοι. Σε πολλές μελέτες αναφέρεται ότι οι καταναλωτές πιστεύουν ότι γνωρίζουν πώς να χειρίζονται τα τρόφιμα με ασφαλή τρόπο, αλλά πολλές φορές οι πληροφορίες που έχουν δεν είναι σωστές ή τις εφαρμόζουν λανθασμένα στη πράξη. Συνεπώς, η βελτίωση της συμπεριφοράς των καταναλωτών ως προς το χειρισμό των τροφίμων μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της συχνότητας των τροφιμογενών λοιμώξεων. Τέλος, η προσομοίωση των προαναφερόμενων λανθασμένων πρακτικών σε εργαστηριακό επίπεδο θα μας έδινε περαιτέρω πληροφορίες ως προς το επίπεδο μεταφοράς των παθογόνων κατά το χειρισμό των τροφίμων και τους παράγοντες που πιθανόν επηρεάζουν τη διασταυρούμενη επιμόλυνση σε οικιακό επίπεδο με απώτερο σκοπό τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4



Μεταφορά των τροφιμογενών παθογόνων *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7 από επιμολυσμένα βόεια φιλέτα διαμέσου επιφανειών τροφίμων σε μη επιμολυσμένα βόεια φιλέτα

Εισαγωγή

Η ασφάλεια των τροφίμων είναι από κοινού υπευθυνότητα των παραγωγών, των επιχειρήσεων τροφίμων, των ελεγκτικών αρχών αλλά και των καταναλωτών, που θα πρέπει να αναγνωρίσουν ότι έχουν μερίδιο ευθύνης για την κατάλληλη αποθήκευση και τον χειρισμό των τροφίμων. Αν και τις τελευταίες δεκαετίες με την νομοθεσία που θεσπίστηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (E.E.) σημαντικές βελτιώσεις έχουν γίνει προς την κατεύθυνση της ασφάλειας των τροφίμων από τη φάρμα σε επίπεδο λιανικής (Official Journal European Communities L139, 2004, Official Journal European Communities L338/1, 2005), πρόσφατες αναφορές επιδεικνύουν το οικιακό περιβάλλον ως σημαντική πηγή τροφολοιμώξεων (Bloomfield, 2001, FDA, 2009, Neal et al., 2012) .

Η διασταυρούμενη επιμόλυνση αναφέρεται στη μεταφορά παθογόνων βακτηρίων από ένα επιμολυσμένο τρόφιμο σε ένα άλλο μέσω των επιφανειών επεξεργασίας. Συνήθεις παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε διασταυρούμενη επιμόλυνση περιλαμβάνουν τα λάθη χειρισμού τροφίμων, όπως η χρήση κοινών πάγκων κοπής για ωμά και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, η επεξεργασία πρώτων υλών επιμολυσμένων με τροφιμογενή παθογόνα από το πρωτογενές στάδιο παραγωγής και οι χειριστές-φορείς λοιμογόνων παραγόντων που λειτουργούν ως πηγή επιμόλυνσης για τα τρόφιμα (EFSA & ECDC, 2013).

Η συμβολή των επιμολυσμένων επιφανειών σε σχέση με τη δυνητική μεταφορά παθογόνων στα τρόφιμα είναι μεγάλη σε σφαγεία, βιομηχανίες, χώρους εστίασης και οικιακές κουζίνες (Kusumaningrum, 2003). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι παθογόνα βακτήρια επιβιώνουν σε αβιοτικές επιφάνειες για ώρες ή ακόμη και μέρες μετά την αρχική επιμόλυνση των επιφανειών (Zhao et al., 1998). Επιπλέον, η παραγωγή κρέατος απαλλαγμένου παθογόνων είναι παγκόσμια πρόκληση και η E.E. έχει ήδη υιοθετήσει προγράμματα πρόληψης ζωοανθρωπνόσων, που μπορεί εν δυνάμει να προκαλέσουν τροφιμογενείς λοιμώξεις. Έτσι, η ποσοτικοποίηση της επικινδυνότητας της διασταυρούμενης επιμόλυνσης που σχετίζεται με διάφορα στάδια από την παραγωγή έως την κατανάλωση τροφίμων παρέχει επιστημονική βάση για τη διαχείρισή της (Sheen & Hwang, 2010).

Η επικινδυνότητα των τροφιμογενών λοιμώξεων που σχετίζεται με τη διασταυρούμενη επιμόλυνση εξαρτάται από δύο παράγοντες: τον πληθυσμό των παθογόνων στις επιφάνειες και την πιθανότητα της μεταφοράς τους στα τρόφιμα σε επίπεδο τελικού καταναλωτή (Bloomfield & Scott, 1997). Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη μεταφορά βακτηρίων από το κρέας σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων και αντιστρόφως (Flores et al., 2006, Lin et al., 2006, Midelet & Carpentier, 2002, Rodriguez et al., 2007, Vorst et al., 2006). Τα επίπεδα μεταφοράς ποικίλουν

και εξαρτώνται από τον μικροοργανισμό, από το υλικό της επιφάνειας επαφής και το είδος του τροφίμου (Chen et al., 2001, Kusumaningrum, 2003, Vorst et al., 2006). Τα περισσότερα από αυτά τα σενάρια διασταυρούμενης επιμόλυνσης προσομοιάζουν μεταφορά από ωμό κρέας σε αβιοτικές επιφάνειες και από αυτές σε λαχανικά ή σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Montville & Schaffner, 2003, Ravishankar et al., 2010, Wachtel et al., 2003). Επιπλέον, τα βακτήρια είναι συνήθως υπό την μορφή βιοϋμενίου στις εξεταζόμενες επιφάνειες (Midelet & Carpentier, 2002, Sheen & Hwang, 2010, Wilks et al., 2006). Άλλες μελέτες έχουν εξετάσει την μεταφορά των παθογόνων κατά τη διάρκεια τεμαχισμού ή κιαδοποίησης τροφίμων (Aarnisalo et al., 2007, Keskinen et al., 2008, Papadopoulou et al., 2012, Pirez-Rodriguez et al., 2007, Sheen, 2008, Vorst et al., 2006).

Σκοπός μελέτης

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της μεταφοράς τροφιμογενών παθογόνων από επιμολυσμένα φιλέτα βόειου κρέατος σε έξι διαδοχικά μη επιμολυσμένα φιλέτα. Ο παράγοντας μικροοργανισμός μελετήθηκε όσον αφορά το βακτηριακό είδος και στέλεχος (*L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* και *E.coli* O157:H7) και το μέγεθος ενοφθαλμίσματος (10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/g). Επιπλέον, διαφορετικοί τύποι επιφανειών (ανοξειδωτου χάλυβα, πολυαιθυλενίου και ξύλινη) και χρόνου επαφής (1 και 15 min) μελετήθηκαν ως παράγοντας που μπορεί να μεταβάλλει τα επίπεδα μεταφοράς. Ο αριθμός των φιλέτων (ενοφθαλμισμένο και έξι διαδοχικά) επίσης διερευνήθηκε αν έχει κάποια επίδραση.

Υλικά και μέθοδοι

Βακτηριακά στελέχη

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 6 στελέχη *L. monocytogenes* (NCTC 10527, ScottA, FMCC B126, FMCC 21085, FMCC 21350 και FMCC 21411), 3 στελέχη *S. Typhimurium* (FMCC 137, 193 και 194) και 3 στελέχη *E. coli* O157:H7 (FMCC-15, 16 και 18).

Επιφάνειες και δείγματα

Επιλέχθηκαν επιφάνειες επαφής τροφίμων των συγκεκριμένων υλικών, ανοξειδωτος χάλυβας (AX), που χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανικό επίπεδο και χώρους μαζικής εστίασης,

καθώς επίσης πολυαιθυλένιο (ΠΑ) και ξύλο (ΞΥ), που χρησιμοποιούνται κυρίως σε οικιακό επίπεδο. Το βόειο κρέας προμηθεύτηκε από τοπικό κρεοπωλείο και κόπηκε σε φιλέτα 5x5x1 cm.

Πειραματικός σχεδιασμός

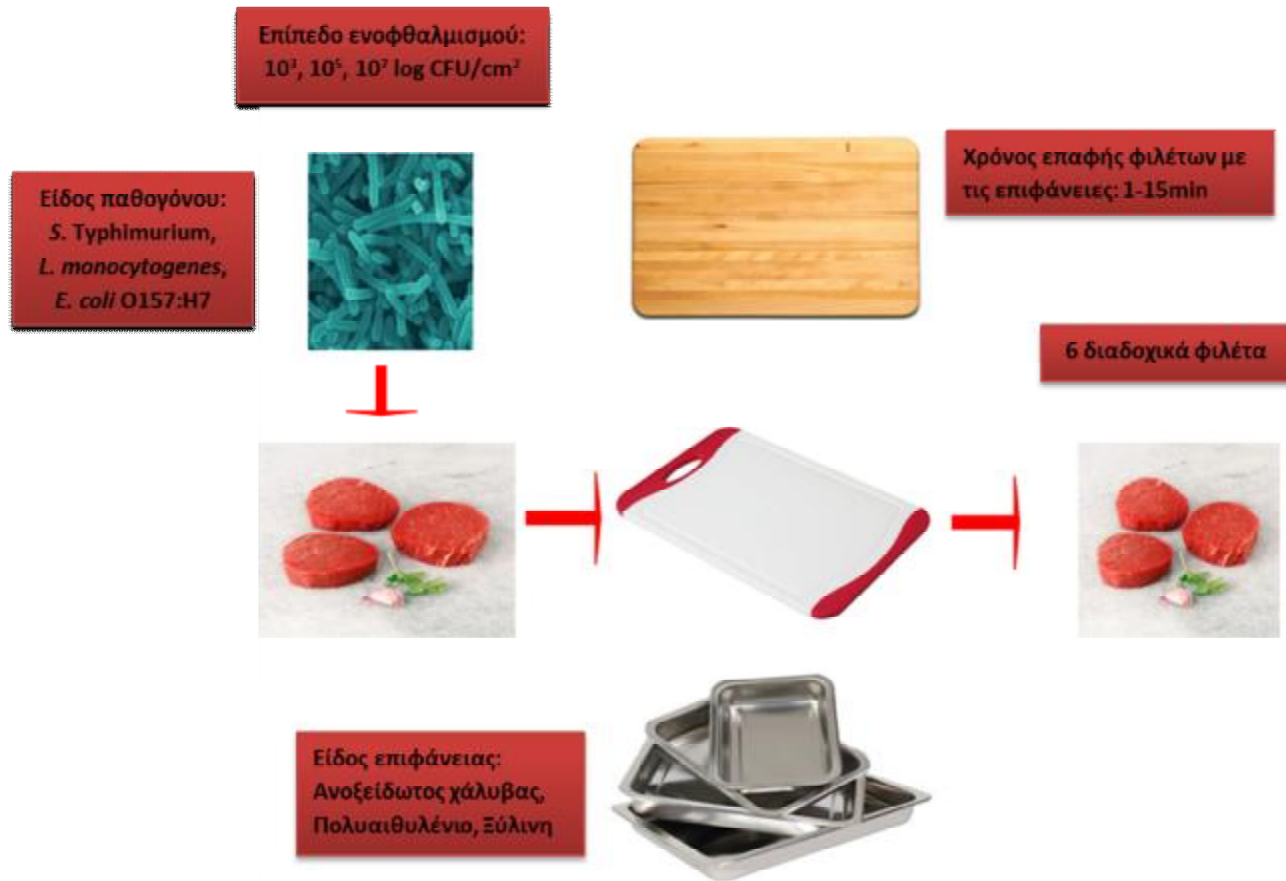
Η άνω επιφάνεια των βόειων φιλέτων επιμολύνθηκε με μικτές καλλιέργειες *L. monocytogenes* ή *S. Typhimurium* ή *E. coli* O157:H7 (Μεταβλητή Α: είδος παθογόνου). Πιο συγκεκριμένα, τα βόεια φιλέτα ενοφθαλμίστηκαν με 250 μl από 10^5 , 10^7 , 10^9 CFU/ml (Μεταβλητή Β: επίπεδο ενοφθαλμίσματος), παρέχοντας πληθυσμούς 10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/g. Ακολούθησε προσκόλληση των βακτηρίων (30 min) στην επιφάνεια των φιλέτων κι έπειτα τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή για συγκεκριμένο χρόνο, 1 ή 15 min (Μεταβλητή Γ: χρόνος επαφής), με τις 3 διαφορετικές επιφάνειες (ανοξείδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο και ξύλο), οι οποίες είχαν οριοθετηθεί σε ίσα τετράγωνα (5 X 5 cm) (Μεταβλητή Δ: είδος επιφάνειας). Εν συνεχεία, αφού αφαιρέθηκαν τα πρώτα φιλέτα, τοποθετήθηκαν στις ίδιες προκαθορισμένες επιφάνειες έξι διαδοχικά (Μεταβλητή Ε: αριθμός φιλέτου) μη επιμολυσμένα βόεια φιλέτα για 1 ή 15 min.

Μικροβιακές αναλύσεις

Τα φιλέτα μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε σακούλα stomacher, προστέθηκε αποστειρωμένο διάλυμα 1/4 Ringer και ομογενοποιήθηκαν για 1 min σε stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical London, UK) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις σε 9 ml διαλύματος 1/4 Ringer και 0,1 ml της κατάλληλης αραιώσης εξαπλώθηκαν σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα και επώαστηκαν για τον κατάλληλο χρόνο και στην κατάλληλη θερμοκρασία ανάλογα με το βακτήριο. Επιπλέον, μη ενοφθαλμισμένα φιλέτα ελέγχθηκαν, ώστε να διασφαλισθεί η απουσία των ανωτέρω παθογόνων. Μετά την επώαση των τρυβλίων τυπικές αποικίες του κάθε βακτηρίου απαριθμήθηκαν και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε CFU/g κρέατος.

Ανάλυση δεδομένων

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικώς χρησιμοποιώντας πολυπαραγοντική ανάλυση διασποράς (**Πίνακας 5**), ώστε να ελεγχθεί η επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών (είδος παθογόνου, επίπεδο ενοφθαλμισμού, υλικό επιφάνειας και χρόνος επαφής) στην εξαρτημένη μεταβλητή (πληθυσμός παθογόνων στα φιλέτα). Κάθε πείραμα διεξήχθη εις διπλούν (2 διαφορετικές παρτίδες κρέατος) με 3 επαναλήψεις για κάθε φιλέτο. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν κατά ζεύγη συγκρίσεις των μέσων όρων των παθογόνων στα επιμολυσμένα διαδοχικά φιλέτα, με τη χρήση του ελέγχου Tukey και οι διαφορές θεωρούνται σημαντικές σε επίπεδο 5 %.



Εικόνα 15. Πειραματικός σχεδιασμός 1^{οο} πειράματος

Αποτελέσματα- Συζήτηση

Ο πληθυσμός των παθογόνων που μεταφέρθηκαν στα διαδοχικά φιλέτα ήταν σε άμεση εξάρτηση με το είδος του βακτηρίου (Α), το επίπεδο ενοφθαλμισμού (Β), τον χρόνο επαφής (Γ), τον τύπος της επιφάνειας (Δ) και τον αριθμό του φιλέτου (Ε), σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την ανάλυση της διακύμανσης (Πίνακας 5). Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* και *E. coli* O157:H7 σε όλα τα φιλέτα που τοποθετήθηκαν στις τρεις διαφορετικές επιφάνειες, χρησιμοποιώντας τρία διαφορετικά επίπεδα νοφθαλμισμού και δυο χρόνους επαφής παρουσιάζονται παρακάτω (Διάγραμμα 29, 30, 31).

Επίδραση του αριθμού του φιλέτου

Όπως προκύπτει από στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 6, 7, 8) ο αριθμός των διαδοχικών φιλέτων που τοποθετήθηκαν στην ίδια επιφάνεια με το πρώτο ενοφθαλμισμένο φιλέτο επηρέασε το επίπεδο μεταφοράς των βακτηρίων. Συγκεκριμένα ο πληθυσμός των βακτηρίων μειώθηκε από τα πρώτα στα τελευταία φιλέτα, ανεξαρτήτως τύπου της επιφάνειας, αρχικού ενοφθαλμίσματος, χρόνου επαφής και είδους παθογόνου και οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές καταγράφονται παρακάτω (Πίνακας 6, 7, 8). Μεταξύ του 1^{ου} και του 2^{ου} φιλέτου μείωση σε επίπεδο 2 log καταγράφηκε ανεξαρτήτως επιπέδου ενοφθαλμισμού. Μεταξύ 1^{ου} και 7^{ου} φιλέτου, όταν τα πρώτα φιλέτα εμβολιάστηκαν με 10⁷ log CFU/ml παρατηρήθηκε μια μείωση της τάξης των 4 log σε σχέση με το τελευταίο φιλέτο. Ομοίως όταν το 1^ο φιλέτο επιμολύνθηκε με 10⁵ CFU/ml και 10³ CFU/ml, παρατηρήθηκε μείωση της τάξης των 3.5 log και 2.5 log, αντίστοιχα.

Η μεταφορά των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* και *E. coli* O157: H7 από τεχνητά επιμολυσμένα φιλέτα μέσω της δίοδου τους από την μηχανή κιμά σε 6 διαδοχικά μη επιμολυσμένα φιλέτα αποτιμήθηκε (Papadopoulou et al., 2012). Ομοίως, σε αυτή τη μελέτη όλα τα επόμενα διαδοχικά φιλέτα επιμολύνθηκαν με φθίνουσα τάση μεταφοράς στα τελευταία φιλέτα. Συγκεκριμένα, καταγράφηκε μείωση της τάξης των 2 log στον πληθυσμό των παθογόνων από το 1^ο έως 7^ο φιλέτο κατά τη δίοδο τους από τη μηχανή κιμά (Papadopoulou et al., 2012). Μείωση της *Salmonella* κατά 3 log καταγράφηκε σε μαρούλι που κόπηκε σε ίδιο πάγκο κοπής με επιμολυσμένο κοτόπουλο αρχικού φορτίου 6 log (Ravishankar et al., 2010). Η μεταφορά της *L. monocytogenes* από ενοφθαλμισμένο σολωμό μέσω της μηχανής τεμαχισμού σε διαδοχικές μη επιμολυσμένες φέτες μελετήθηκε (Aarnisalo et al., 2007). Στην προαναφερόμενη μελέτη χαμηλότερος πληθυσμός της *L. monocytogenes* επίσης μεταφέρθηκε στις επόμενες φέτες όταν το αρχικό επίπεδο

ενοφθαλμισμού ήταν χαμηλότερο και μείωση της τάξης των 3 log καταγράφηκε μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} φέτας σολωμού.

Επίδραση του είδους του βακτηρίου

Κάθε τροφιμογενές παθογόνο έδειξε διαφορετική τάση μεταφοράς, εκφρασμένη ως μέσος πληθυσμός των επιμολυσμένων φιλέτων ($P < 0,05$). Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της *S. Typhimurium* στα διαδοχικά επιμολυσμένα φιλέτα ήταν στατιστικώς χαμηλότερος σε σχέση με την *E. coli* και την *L. monocytogenes*, η οποία συνεισέφερε σε υψηλότερους πληθυσμούς επιμόλυνσης στα μη-ενοφθαλμισμένα φιλέτα. Η *E. coli* O157:H7 επίσης έχει βρεθεί να μεταφέρεται σε χαμηλότερα επίπεδα από τη *L. monocytogenes* μεταξύ μαχαιριών τεμαχισμού και φύλλων μαρουλιού (Zilelidou et al., 2015). Η *L. monocytogenes* είχε υψηλότερη τάση μεταφοράς στα μη επιμολυσμένα διαδοχικά φιλέτα κι έτσι φαίνεται να αποκολλάται πιο εύκολα από τις αβιοτικές επιφάνειες. Η *L. monocytogenes* δεν θεωρείται να σχηματίζει ισχυρά βιοϋμένια καθώς προσκολλάται χαλαρά στις επιφάνειες κι έτσι η επικινδυνότητα όσον αφορά την επιμόλυνση τροφίμων είναι αυξημένη. Από την άλλη πλευρά το στατιστικώς σημαντικά μειωμένο επίπεδο μεταφοράς της *S. Typhimurium* μπορεί να οφείλεται στην ισχυρή προσκόλληση στις επιφάνειες και το σχηματισμό βιοϋμενίου, δικαιολογώντας τον μειωμένο πληθυσμό του παθογόνου στα επόμενα φιλέτα. Αυτά τα δεδομένα είναι σε συμφωνία με τα ευρύματα μελετών που υποστηρίζουν ότι η *L. monocytogenes* δεν σχηματίζει ισχυρά βιοϋμένια σε σχέση με τη *S. Typhimurium* (Chorianopoulos et al., 2011; Giaouris et al., 2012; Giaouris and Nychas, 2006; Stepanovič et al., 2004).

Πίνακας 5. Επίδραση του αρχικού ενοφθαλμίσματος, του είδους του μικροοργανισμού, του υλικού της επιφάνειας, του αριθμού του φιλέτου και του χρόνου επαφής, στη μεταφορά των βακτηρίων στα διαδοχικά φιλέτα μέσω της επαφής με τις επιφάνειες (Ανάλυση διακύμανσης)

	Βαθμοί ελευθερίας (df)	F-τιμή (F-value)	Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας P-τιμή (P-value)
Είδος του βακτηρίου (Παράγοντας Α)	2	163,758	0,000
Είδος της επιφάνειας (Παράγοντας Β)	2	30,092	0,000
Επίπεδο ενοφθαλμίσματος* (Παράγοντας Γ)	2	6148,180	0,000
Αριθμός φιλέτου (Παράγοντας Δ)	6	1316,247	0,000
Χρόνος επαφής (Παράγοντας Ε)	1	23,998	0,000
A*B	4	19,747	0,000
A*Γ	4	26,243	0,000
A*Δ	12	4,666	0,000
A*Ε	2	34,807	0,000
B*Γ	4	10,264	0,000
B*Δ	12	14,162	0,000
B*Ε	2	7,045	0,001
Γ*Δ	12	17,627	0,000
Γ*Ε	2	5,666	0,04
Δ*Ε	6	5,931	0,000
A*B*Γ	8	5,798	0,000
A*B*Δ	24	1,450	0,074
A*B*Ε	4	16,451	0,000
A*Γ*Δ	24	4,079	0,000
A*Γ*Ε	4	8,361	0,000
A*Δ*Ε	12	3,463	0,000
B*Γ*Δ	24	3,857	0,000
B*Γ*Ε	4	7,288	0,000
B*Δ*Ε	12	1,766	0,049
Γ*Δ*Ε	12	2,634	0,002
A*B*Γ*Δ	48	2,123	0,000
B*Γ*Δ*Ε	24	1,130	0,301
A*B*Δ*Ε	24	2,957	0,000
A*Γ*Δ*Ε	8	1,269	0,173
A*B*Γ*Ε	48	2,220	0,000
A*B*Γ*Δ*Ε	48	2,220	0,000

Επίδραση του τύπου της επιφάνειας

Μεταξύ των διαφόρων τύπων επιφανειών, το ξύλο φάνηκε να συνεισφέρει σε υψηλότερους πληθυσμούς στα επιμολυσμένα διαδοχικά φιλέτα σε σχέση με τις άλλες δυο επιφάνειες που ελέχθησαν ($P < 0,05$). Ωστόσο, αντιφατικά αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την επίδραση του τύπου της επιφάνειας από άλλες μελέτες. Για παράδειγμα, η μεταφορά της *S. Enteritidis* από δέρμα κοτόπουλου σε ντομάτες δεν επηρεάστηκε από τον τύπο των επιφανειών που χρησιμοποιήθηκαν (ξύλο, γυαλί, ανοξείδωτος χάλυβας, πλαστικό) (Soares et al., 2012). Η μεταφορά της *S. Typhimurium* από επιφάνειες σε φέτες αγγουριού ήταν υψηλότερες όταν χειρίστηκαν σε ανοξείδωτο χάλυβα σε σύγκριση με το ξύλο και το πλαστικό, αλλά αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε κυρίως σε επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν μετά από 1 ώρα από τον αρχικό ενοφθαλμισμό (Moore et al., 2007). Η ποσοτικοποίηση της μεταφοράς της *L. monocytogenes* από βιοϋμένια σε διαδοχικά τεμάχια βόειου κρέατος μετά από επαφή για 30 sec με τις επιφάνειες (ανοξείδωτος χάλυβας, PVC, PU) και με βάρος 500 g έδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά όσον αφορά τον τύπο της επιφάνειας (Midelet and Carpentier, 2002). Στην παραπάνω μελέτη, το υψηλότερο ποσοστό βακτηρίων που μεταφέρθηκαν στο κρέας από τις πολυμερείς επιφάνειες σε σχέση με τον ανοξείδωτο χάλυβα, πιθανόν να οφείλεται στο υψηλότερο αρχικό σχηματισμό βιοϋμένιου στα πολυμερή. Ο διαφορετικός τύπος τροφίμου (δηλ. βόειο, κοτόπουλο, αγγούρι, ντομάτα) που χαρακτηρίζεται από διαφορετική υγρασία και ποσοστό λίπους μπορεί να είναι ο λόγος που παρατηρούνται αυτά τα αντιφατικά αποτελέσματα. Ο Kusumaningrum, (2003) όντως παρατήρησε ότι ακόμη και στον ίδιο τύπο επιφάνειας (ανοξείδωτος χάλυβας) τα βακτήρια μεταφερόταν πιο εύκολα στις φέτες αγγουριού παρά στο φιλέτο κοτόπουλου, εξαιτίας του διαφορετικού ποσοστού υγρασίας των παραπάνω τροφίμων.

Επίδραση του επιπέδου ενοφθαλμισμού

Παρόλο που ο επιπολασμός και η συγκέντρωση των παθογόνων *S. enterica*, *L. monocytogenes* και *E. coli* σε φυσικά επιμολυσμένα βόεια προϊόντα αναφέρεται ως χαμηλή (Duffy et al., 2006; Rhoades et al., 2009), στη παρούσα μελέτη τρία διαφορετικά επίπεδα ενοφθαλμισμού εξετάστηκαν. Το χαμηλό επίπεδο ενοφθαλμισμού αναπαριστά ένα σενάριο προσαρμοσμένο στη πραγματικότητα. Το μέσο και υψηλό επίπεδο ενοφθαλμισμού αντιπροσωπεύει όχι μόνο το χειρότερο σενάριο της επιμόλυνσης που οφείλεται στην αποτυχία των καταναλωτών να

χειριστούν τα τρόφιμα με ασφάλεια, αλλά παράλληλα παρέχει πληροφορίες ποσοτικοποίησης της διασταυρούμενης επιμόλυνσης παθογόνων μικροοργανισμών.

Το επίπεδο ενοφθαλμισμού (10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/g) φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση μεταξύ όλων των συνδυασμών και όλων των παραγόντων από το 1^ο έως το 7^ο φιλέτο σε επίπεδο 5 %. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλα τα 6 διαδοχικά φιλέτα επιμολύνθηκαν από τις επιφάνειες σε όλα τα επίπεδα ενοφθαλμισμού (10^3 , 10^5 , 10^7 CFU/ml) του πρώτου φιλέτου που χρησιμοποιήθηκαν. Όπως αναμενόταν, τα πρώτα φιλέτα είχαν τα υψηλότερα επίπεδα επιμόλυνσης με τάση μείωσης για τα διαδοχικά φιλέτα που ερχόταν σε επαφή με την ίδια επιφάνεια χωρίς απολύμανση.

Η επίδραση του επιπέδου ενοφθαλμισμού κατά τη μεταφορά τροφιμογενών παθογόνων από επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων σε μη επιμολυσμένα τρόφιμα έχει διερευνηθεί κι από άλλες μελέτες. Ο *S. aureus* και η *E. coli* O157:H7 μεταφέρθηκαν σε όλες τις φέτες ζαμπόν που εξετάστηκαν (20 διαδοχικές) και ο πληθυσμός τους εξαρτάται άμεσα από τα διαφορετικά αρχικά επίπεδα ενοφθαλμισμού της λεπίδας της μηχανής (10^8 , 10^6 και 10^4 CFU/λεπίδα) (Pirez-Rodriguez et al., 2007). Το αρχικό επίπεδο ενοφθαλμισμού της λεπίδας (1, 2, και 3 log CFU ανά λεπίδα) επίσης συσχετίστηκε με το βαθμό της μεταφοράς της *L. monocytogenes* μεταξύ εξοπλισμού επεξεργασίας και αλλαντικών (γαλοπούλα, σαλάμι, Μπολόνια) (Lin et al., 2006). Το αρχικό επίπεδο ενοφθαλμισμού επίσης φάνηκε να επηρεάζει τη μεταφορά μεταξύ επιφανειών του *Enterobacter aerogenes* κάτω από διαφορετικά σενάρια επιμόλυνσης που αφορούν κοτόπουλο, χέρια, μαρούλι, και επιφάνειες κοπής (Chen et al., 2001, Montville and Schaffner, 2003).

Επίδραση του χρόνου επαφής

Ο χρόνος επαφής 1 ή 15 min, μεταξύ φιλέτου και επιφάνειας δεν επηρέασε τη μεταφορά των παθογόνων στα διαδοχικά μη επιμολυσμένα φιλέτα ($P = 0,206$). Ομοίως, ο χρόνος επαφής δεν είχε καμία επίδραση στο ποσοστό μεταφοράς της *S. Typhimurium* μέσω επιφανειών (ξύλο, πλακάκι και μοκέτα) σε ψωμί και σε λουκάνικο Μπολόνια (Dawson et al., 2007). Ουσιαστικά, όσον αφορά το χρόνο επαφής της παραπάνω μελέτης φάνηκε να επηρεάζει μόνο μετά από παραμονή του παθογόνου άνω των 8 h στις επιφάνειες, χρόνο στον οποίο η προσκόλληση των βακτηρίων είναι πιθανόν μη αντιστρεπτή στις επιφάνειες.

Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη διερεύνησε φαινόμενα διασταυρούμενης επιμόλυνσης που λαμβάνουν χώρα σε χώρους επεξεργασίας ωμού κρέατος αλλά και σε οικιακό περιβάλλον, παρέχοντας πληροφορίες για τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη βακτηριακή μεταφορά. Αυτή η μελέτη για πρώτη φορά διεξήγαγε ένα πολυ-παραγοντικό πείραμα που συμπεριλάμβανε τρία μεγέθη ενοφθαλμίσματος, τρεις τύπους υλικού που χρησιμοποιούνται κατά την επεξεργασία τροφίμων, τρία είδη με μικτά στελέχη παθογόνων και δύο χρόνους επαφής, υπογραμμίζοντας ότι η διασταυρούμενη επιμόλυνση είναι μια πολύ-παραγοντική διεργασία που εξαρτάται άμεσα από τους παραπάνω παράγοντες αλλά και τις αλληλεπιδράσεις τους. Συμπερασματικά, το υλικό των επιφανειών επαφής είναι ένας κύριος παράγοντας στο χειρισμό ωμών τροφίμων ζωικής προέλευσης επιμολυσμένων με παθογόνους μικροοργανισμούς. Όσον αφορά τις επιφάνειες που εξετάστηκαν, το ξύλο φάνηκε να είναι η λιγότερο ασφαλής επιλογή καθώς επιμόλυνε τα διαδοχικά φιλέτα με υψηλότερο βακτηριακό πληθυσμό. Η βακτηριακή μεταφορά επίσης εξαρτιόταν από το αρχικό επίπεδο ενοφθαλμισμού, το οποίο με τη σειρά του επηρέαζε τον αριθμό και το επίπεδο επιμόλυνσης των διαδοχικών φιλέτων. Έτσι, η επιλογή διαφορετικών μεγεθών ενοφθαλμίσματος θεωρείται σημαντικός παράγοντας κατά το σχεδιασμό πειραμάτων, ώστε να συνεισφέρει στην αποτίμηση του μικροβιολογικού κινδύνου. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο χαμηλότερος πληθυσμός της *S. Typhimurium* που καταγράφηκε στα διαδοχικά φιλέτα σε σχέση με τα άλλα δύο παθογόνα, πιθανόν να οφείλεται στην ισχυρότερη προσκόλληση του μικροοργανισμού στις αβιοτικές επιφάνειες. Ωστόσο, όλα τα τροφιμογενή παθογόνα επιμόλυναν και τα έξι διαδοχικά φιλέτα άμεσα και ακόμη ο ελάχιστος χρόνος επαφής (1 min) οδήγησε στη μεταφορά μεγάλου πληθυσμού των βακτηρίων. Τα δεδομένα αυτής της μελέτης παρέχουν την επιστημονική βάση για το χαρακτηρισμό του κινδύνου και την εφαρμογή αποτελεσματικής διαχείρισης του κινδύνου για την πρόληψη της διασταυρούμενης επιμόλυνσης σε όλα τα στάδια της τροφικής αλυσίδας.

Πίνακας 6. Μεταφορά (log CFU/g) της *L. monocytogenes* από το 1^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε 6 διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών (ανοξειδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν 3 επίπεδα ενοφθαλμισμού (10⁷, 10⁵, 10³ CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min. Σε κάθε ομάδα διαφορετικών δειγμάτων κρέατος για το ίδιο επίπεδο ενοφθαλμισμού, τύπο επιφάνειας και χρόνο επαφής διαφορετικοί εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

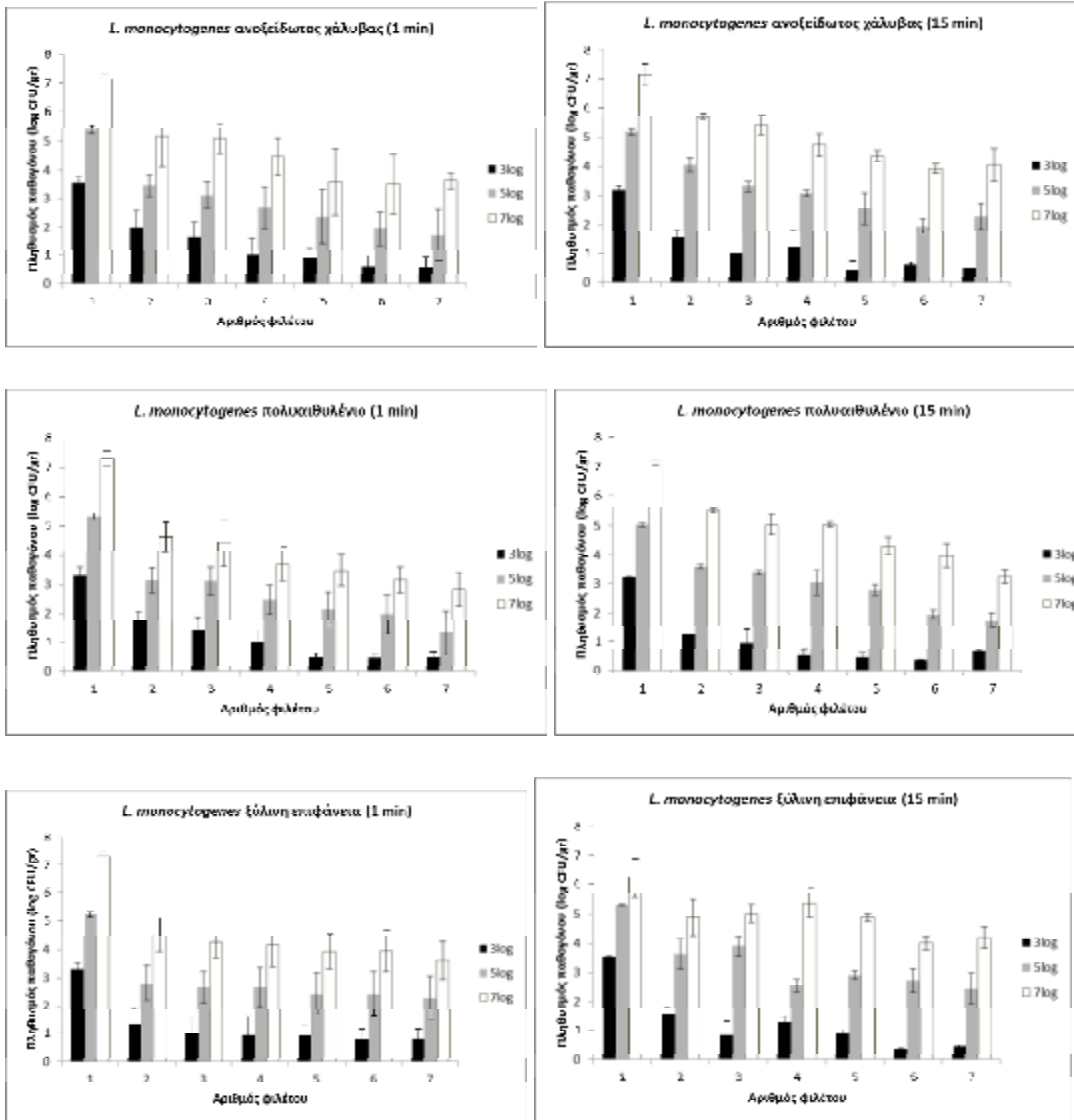
Επίπεδο αρχικού ενοφθαλμισμού (CFU/g)	Δείγμα	Πληθυσμός (log CFU/g)					
		<i>L. monocytogenes</i>					
		Ανοξειδωτος χάλυβας		Πολυαιθυλένιο		Ξύλο	
		1 min	15 min	1 min	15 min	1 min	15 min
Υψηλό επίπεδο (10 ⁷)	Φιλέτο	7,18±0,14 ^a	7,14±0,37 ^a	7,32±0,25 ^a	7,15±0,11 ^a	7,30±0,19 ^a	6,23±0,64 ^a
	1	5,14±1,03 ^b	5,71±0,07 ^b	4,60±0,53 ^b	5,50±0,07 ^b	4,52±0,60 ^b	4,90±0,63 ^{bc}
	2	5,08±0,51 ^b	5,42±0,32 ^{bc}	4,43±0,79 ^{bc}	5,02±0,34 ^b	4,27±0,56 ^b	5,03±0,30 ^{abc}
	3	4,45±0,63 ^{bc}	4,74±0,38 ^{cd}	3,71±0,58 ^{bcd}	5,05±0,09 ^b	4,17±0,79 ^b	5,39±0,49 ^{ab}
	4	3,57±1,18 ^{bc}	4,36±0,18 ^d	3,48±0,53 ^{cd}	4,28±0,30 ^c	3,93±0,61 ^b	4,90±0,15 ^{abc}
	5	3,49±1,04 ^{bc}	3,93±0,16 ^d	3,16±0,44 ^d	3,97±0,41 ^c	3,95±0,73 ^b	4,02±0,22 ^{ac}
	6	3,60±0,43 ^c	4,06±0,56 ^d	2,83±0,58 ^d	3,23±0,25 ^d	3,62±0,68 ^b	4,21±0,37 ^{ac}
Μέσο επίπεδο (10 ⁵)	Φιλέτο	5,38±0,09 ^a	5,20±0,11 ^a	5,32±0,14 ^a	5,02±0,07 ^a	5,23±0,10 ^a	5,33±0,05 ^a
	1	3,44±0,44 ^b	4,06±0,26 ^b	3,14±0,38 ^b	3,58±0,07 ^b	2,80±0,61 ^b	3,63±0,52 ^{ab}
	2	3,10±0,49 ^{bc}	3,32±0,18 ^{bc}	3,12±0,46 ^{bc}	3,38±0,08 ^b	2,66±0,56 ^b	3,91±0,34 ^{ab}
	3	2,65±0,50 ^{bcd}	3,08±0,11 ^{cd}	2,46±0,72 ^{bcd}	3,03±0,42 ^{bc}	2,65±0,56 ^b	2,55±0,22 ^b
	4	2,35±0,60 ^{cd}	2,54±0,53 ^{cde}	2,13±0,93 ^{bcd}	2,78±0,17 ^c	2,42±0,76 ^b	2,91±0,15 ^b
	5	1,94±0,69 ^d	1,93±0,26 ^{de}	1,97±0,58 ^{cd}	1,93±0,14 ^d	2,41±0,81 ^b	2,72±0,41 ^b
	6	1,70±0,76 ^d	2,28±0,46 ^e	1,32±0,25 ^d	1,73±0,27 ^d	2,27±0,8 ^b	2,44±0,53 ^b
Χαμηλό επίπεδο (10 ³)	Φιλέτο	3,52±0,15 ^a	3,19±0,15 ^a	3,30±0,31 ^a	3,22±0,03 ^a	3,30±0,22 ^a	3,55±0,08 ^a
	1	1,96±0,20 ^b	1,52±0,29 ^b	1,74±0,31 ^b	1,22±0,29 ^b	1,32±0,60 ^b	1,53±0,31 ^b
	2	1,63±0,49 ^b	1,00±0,61 ^b	1,38±0,50 ^{bc}	0,94±0,48 ^{bc}	0,98±0,54 ^b	0,83±0,55 ^b
	3	0,97±0,25 ^c	1,22±0,60 ^b	1,03±0,37 ^{cd}	0,53±0,20 ^{bc}	0,93±0,64 ^b	1,26±0,23 ^{bc}
	4	0,87±0,39 ^c	0,44±0,27 ^b	0,49±0,12 ^{de}	0,45±0,14 ^c	0,91±0,37 ^b	0,87±0,29 ^{bc}
	5	0,57±0,15 ^c	0,59±0,08 ^b	0,44±0,16 ^{de}	0,37±0,01 ^c	0,77±0,38 ^b	0,36±0,02 ^c
	6	0,54±0,22 ^c	0,47±0,02 ^b	0,49±0,15 ^e	0,67±0,03 ^c	0,79±0,37 ^b	0,45±0,03 ^c

Πίνακας 7. Μεταφορά (log CFU/g) της *S. Typhimurium* από το 1^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε 6 διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών (ανοξειδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν 3 επίπεδα ενοφθαλμισμού (10⁷, 10⁵, 10³ CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min. Σε κάθε ομάδα διαφορετικών δειγμάτων κρέατος για το ίδιο επίπεδο ενοφθαλμισμού, τύπο επιφάνειας και χρόνο επαφής διαφορετικοί εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

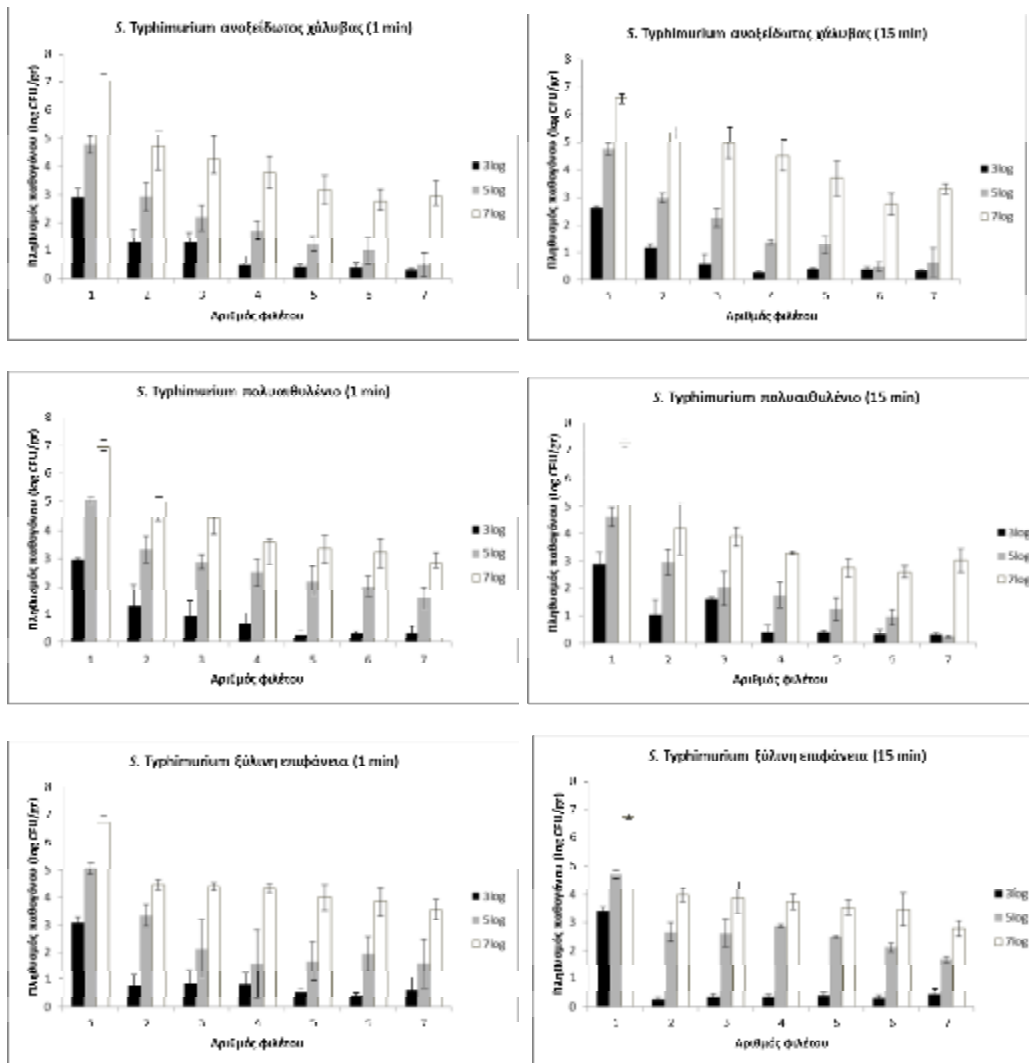
Επίπεδο αρχικού ενοφθαλμισμού (CFU/g)	Δείγμα	Πληθυσμός (log CFU/g)					
		<i>S. Typhimurium</i>					
		Ανοξειδωτος χάλυβας		Πολυαιθυλένιο		Ξύλο	
	1 min	15 min	1 min	15 min	1 min	15 min	
Υψηλό επίπεδο (10 ⁷)	Φιλέτο	7,05±0,22 ^a	6,56±0,19 ^a	6,94±0,14 ^a	7,22±0,13 ^a	6,69±0,28 ^a	6,75±0,09 ^a
	1	4,73±0,86 ^b	5,33±0,21 ^b	4,97±0,64 ^b	4,17±0,96 ^b	4,45±0,18 ^b	3,98±0,24 ^b
	2	4,29±0,51 ^{bc}	4,98±0,55 ^b	4,46±0,57 ^{bc}	3,88±0,35 ^{bc}	4,38±0,13 ^{bc}	3,89±0,56 ^b
	3	3,79±0,56 ^{cd}	4,52±0,56 ^{bc}	3,56±0,78 ^{cd}	3,29±0,06 ^{cd}	4,31±0,16 ^{bc}	3,75±0,27 ^{bc}
	4	3,16±0,52 ^{de}	3,69±0,62 ^{cd}	3,35±0,53 ^d	2,73±0,32 ^{bcd}	3,98±0,47 ^{bcd}	3,53±0,28 ^{bc}
	5	2,76±0,31 ^{de}	2,76±0,39 ^d	3,21±0,57 ^d	2,58±0,22 ^d	3,82±0,51 ^{cd}	3,47±0,59 ^{bc}
	6	2,95±0,31 ^e	3,31±0,18 ^d	2,83±0,17 ^d	3,01±0,43 ^{bcd}	3,54±0,37 ^d	2,78±0,27 ^c
Μέσο επίπεδο (10 ⁵)	Φιλέτο	4,78±0,32 ^a	4,76±0,21 ^a	5,02±0,11 ^a	4,60±0,35 ^a	5,03±0,19 ^a	4,68±0,16 ^a
	1	2,93±0,51 ^b	2,98±0,17 ^b	3,33±0,48 ^b	2,95±0,48 ^b	3,34±0,39 ^b	2,66±0,34 ^b
	2	2,18±0,46 ^c	2,27±0,34 ^b	2,87±0,26 ^{bc}	1,99±0,62 ^{bc}	2,11±1,08 ^{bc}	2,62±0,49 ^{bc}
	3	1,70±0,33 ^{cd}	1,38±0,10 ^c	2,50±0,47 ^{cd}	1,73±0,45 ^c	1,57±1,23 ^c	2,88±0,05 ^{bc}
	4	1,22±0,29 ^d	1,28±0,31 ^{cd}	2,18±0,53 ^{cde}	1,24±0,41 ^{cd}	1,66±0,73 ^c	2,51±0,04 ^{bc}
	5	0,99±0,47 ^{de}	0,49±0,16 ^{cd}	2,01±0,38 ^{de}	0,94±0,28 ^{cd}	1,94±0,65 ^{bc}	2,11±0,16 ^{cd}
	6	0,48±0,40 ^e	0,64±0,51 ^d	1,58±0,40 ^e	0,25±0,03 ^d	1,59±0,91 ^c	1,68±0,12 ^d
Χαμηλό επίπεδο (10 ³)	Φιλέτο	2,90±0,32 ^a	2,64±0,05 ^a	2,95±0,07 ^a	2,86±0,46 ^a	3,06±0,22 ^a	3,42±0,14 ^a
	1	1,28±0,48 ^b	1,16±0,12 ^b	1,27±0,80 ^b	1,02±0,57 ^b	0,76±0,39 ^b	0,25±0,09 ^b
	2	1,27±0,38 ^b	0,58±0,34 ^c	0,93±0,55 ^{bc}	1,61±0,06 ^{bc}	0,81±0,53 ^b	0,33±0,11 ^b
	3	0,49±0,30 ^c	0,27±0,04 ^c	0,66±0,40 ^{bc}	0,41±0,25 ^c	0,78±0,44 ^b	0,34±0,08 ^b
	4	0,42±0,07 ^c	0,41±0,06 ^c	0,28±0,14 ^c	0,41±0,25 ^c	0,52±0,15 ^b	0,39±0,10 ^b
	5	0,38±0,16 ^c	0,39±0,09 ^c	0,31±0,07 ^c	0,34±0,17 ^c	0,40±0,11 ^b	0,28±0,12 ^b
	6	0,29±0,51 ^c	0,35±0,04 ^c	0,33±0,22 ^c	0,32±0,06 ^c	0,58±0,11 ^b	0,43±0,19 ^b

Πίνακας 8. Μεταφορά (log CFU/g) της *E. coli* O157:H7 από το 1^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε 6 διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών (ανοξείδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν 3 επίπεδα ενοφθαλμισμού (10⁷, 10⁵, 10³ CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min. Σε κάθε ομάδα διαφορετικών δειγμάτων κρέατος για το ίδιο επίπεδο ενοφθαλμισμού, τύπο επιφάνειας και χρόνο επαφής διαφορετικοί εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).

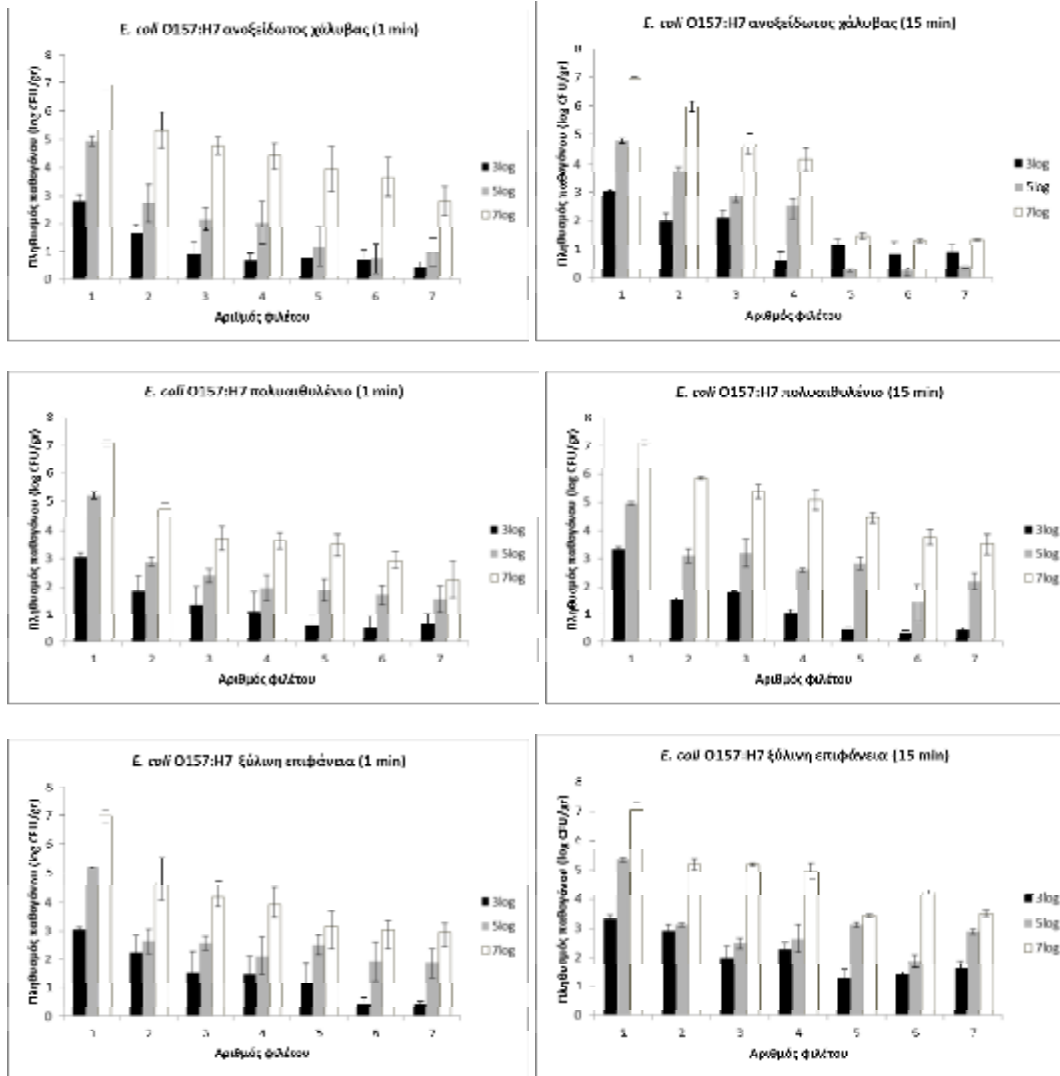
Επίπεδο αρχικού ενοφθαλμισμού (CFU/g)	Δείγμα	Πληθυσμός (log CFU/g)					
		<i>E. coli</i> O157:H7					
		Ανοξείδωτος χάλυβας		Πολυαιθυλένιο		Ξύλινη επιφάνεια	
	1 min	15 min	1 min	15 min	1 min	15 min	
Υψηλό επίπεδο (10 ⁷)	Φιλέτο	6,91±0,19 ^a	6,90±0,09 ^a	7,11±0,13 ^a	7,10±0,10 ^a	6,99±0,21 ^a	7,05±0,24 ^a
	1	5,32±0,52 ^b	5,97±0,18 ^b	4,72±0,21 ^b	5,86±0,05 ^b	4,68±0,62 ^b	5,20±0,18 ^b
	2	4,76±0,63 ^{bc}	4,68±0,35 ^c	3,71±0,43 ^c	5,38±0,25 ^{bc}	4,18±0,32 ^b	5,20±0,05 ^b
	3	4,40±0,58 ^{bcd}	4,15±0,39 ^c	3,63±0,29 ^c	5,09±0,34 ^{cd}	3,92±0,46 ^{bc}	4,95±0,30 ^b
	4	3,94±0,64 ^{cd}	1,47±0,11 ^d	3,49±0,40 ^{cd}	4,46±0,19 ^{de}	3,16±0,80 ^c	3,45±0,06 ^d
	5	3,66±0,20 ^{de}	1,32±0,06 ^d	2,93±0,31 ^d	3,76±0,29 ^{ef}	3,03±0,67 ^c	4,24±0,06 ^c
	6	2,81±0,63 ^e	1,36±0,03 ^d	2,25±0,65 ^e	3,50±0,37 ^f	2,94±0,53 ^c	3,51±0,11 ^d
	Φιλέτο	4,94±0,17 ^a	4,77±0,09 ^a	5,21±0,13 ^a	4,96±0,07 ^a	5,16±0,02 ^a	5,36±0,08 ^a
	1	2,73±0,67 ^b	3,73±0,17 ^b	2,87±0,16 ^b	3,09±0,23 ^b	2,62±0,43 ^b	3,12±0,06 ^b
	2	2,13±0,41 ^{bc}	2,84±0,13 ^c	2,38±0,22 ^{bc}	3,19±0,51 ^b	2,55±0,24 ^b	2,48±0,19 ^c
	3	2,01±0,78 ^{bc}	2,53±0,23 ^c	1,96±0,44 ^{cd}	2,58±0,06 ^b	2,10±0,67 ^b	2,65±0,48 ^{bc}
	4	1,17±0,70 ^{cd}	0,30±0,04 ^d	1,87±0,38 ^{cd}	2,81±0,22 ^b	2,49±0,34 ^b	3,12±0,09 ^b
5	0,72±0,52 ^d	0,27±0,05 ^d	1,71±0,35 ^{cd}	1,44±0,68 ^c	1,90±0,69 ^b	1,85±0,22 ^d	
6	0,96±0,50 ^d	0,38±0,04 ^d	1,55±0,48 ^d	2,18±0,28 ^{bc}	1,84±0,52 ^b	2,90±0,08 ^{bc}	
Μέσο επίπεδο (10 ⁵)	Φιλέτο	2,81±0,22 ^a	3,02±0,05 ^a	3,05±0,14 ^a	3,33±0,08 ^a	3,05±0,09 ^a	3,31±0,16 ^a
	1	1,64±0,34 ^b	1,97±0,30 ^b	1,83±0,54 ^b	1,51±0,08 ^c	2,23±0,59 ^{ab}	2,92±0,20 ^{ab}
	2	0,88±0,45 ^c	2,10±0,26 ^{bc}	1,34±0,67 ^{bc}	1,77±0,04 ^b	1,50±0,75 ^b	1,98±0,40 ^{cd}
	3	0,66±0,27 ^c	0,57±0,33 ^{cd}	1,12±0,69 ^{bc}	1,03±0,13 ^d	1,45±0,65 ^{bc}	2,28±0,21 ^{bc}
	4	0,75±0,36 ^c	1,15±0,22 ^d	0,60±0,33 ^c	0,45±0,12 ^c	1,12±0,71 ^{cd}	1,25±0,31 ^{de}
	5	0,70±0,36 ^c	0,82±0,47 ^d	0,48±0,44 ^c	0,35±0,05 ^c	0,44±0,18 ^d	1,39±0,07 ^{de}
	6	0,41±0,22 ^c	0,88±0,29 ^d	0,63±0,41 ^c	0,41±0,09 ^c	0,42±0,10 ^d	1,60±0,28 ^{cde}
Χαμηλό επίπεδο (10 ³)	Φιλέτο	2,81±0,22 ^a	3,02±0,05 ^a	3,05±0,14 ^a	3,33±0,08 ^a	3,05±0,09 ^a	3,31±0,16 ^a
	1	1,64±0,34 ^b	1,97±0,30 ^b	1,83±0,54 ^b	1,51±0,08 ^c	2,23±0,59 ^{ab}	2,92±0,20 ^{ab}
	2	0,88±0,45 ^c	2,10±0,26 ^{bc}	1,34±0,67 ^{bc}	1,77±0,04 ^b	1,50±0,75 ^b	1,98±0,40 ^{cd}
	3	0,66±0,27 ^c	0,57±0,33 ^{cd}	1,12±0,69 ^{bc}	1,03±0,13 ^d	1,45±0,65 ^{bc}	2,28±0,21 ^{bc}
	4	0,75±0,36 ^c	1,15±0,22 ^d	0,60±0,33 ^c	0,45±0,12 ^c	1,12±0,71 ^{cd}	1,25±0,31 ^{de}
	5	0,70±0,36 ^c	0,82±0,47 ^d	0,48±0,44 ^c	0,35±0,05 ^c	0,44±0,18 ^d	1,39±0,07 ^{de}
	6	0,41±0,22 ^c	0,88±0,29 ^d	0,63±0,41 ^c	0,41±0,09 ^c	0,42±0,10 ^d	1,60±0,28 ^{cde}



Διάγραμμα 29. Μέσος πληθυσμός ± τυπική απόκλιση (log CFU/g) της *L. monocytogenes* από το 1^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε έξι διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών επαφής (ανοξείδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν τρία επίπεδα ενοφθαλμισμού (10^7 , 10^5 , 10^3 CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min.



Διάγραμμα 30. Μέσος πληθυσμός \pm τυπική απόκλιση (log CFU/g) της *S. Typhimurium* από το 1^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε έξι διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών (ανοξειδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν τρία επίπεδα ενοφθαλμισμού (10^7 , 10^5 , 10^3 CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min.



Διάγραμμα 31. Μέσος πληθυσμός ± τυπική απόκλιση (log CFU/g) της *E. coli* O157:H7 από το 1^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε έξι διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών (ανοξείδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν τρία επίπεδα ενοφθαλμισμού (10^7 , 10^5 , 10^3 CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5



Διασταυρούμενη επιμόλυνση *S. Typhimurium* από βόεια φιλέτα σε ντομάτες διαμέσου οικιακού εξοπλισμού και επίδραση κοινών τρόπων καθαρισμού και απολύμανσης

Εισαγωγή

Η σημασία των επιμολυσμένων επιφανειών ως πηγή μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα επισημάνθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4). Αν και οι καταναλωτές φαίνεται να γνωρίζουν τη σημασία του καθαρού οικιακού εξοπλισμού για τον χειρισμό τροφίμων, σημαντικό ποσοστό στην πράξη εφαρμόζει ανεπαρκείς πρακτικές, σύμφωνα με τα δεδομένα που λήφθηκαν από το ερωτηματολόγιο (ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3). Ωστόσο, κι άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το 25 % των καταναλωτών δηλώνουν ότι χρησιμοποιούν τους ίδιους πάγκους κοπής στους οποίους έχουν χειριστεί ωμό κρέας χωρίς κάποιο είδους καθαρισμό (Redmond & Griffith, 2003). Επιπλέον, στην πραγματικότητα περίπου 66-81 % των καταναλωτών χρησιμοποιούν άπλυτους ή ανεπαρκώς καθαρισμένους πάγκους κοπής (Redmond & Griffith, 2003). Σε έρευνα βιντεοσκόπησης σχετικά με το χειρισμό τροφίμων, μόνο 29% των καταναλωτών καθάρισε επαρκώς τις επιφάνειες όπου χειρίστηκε ωμό κρέας (Anderson et al., 2004). Επιπροσθέτως, η πλειοψηφία των καταναλωτών προκαλεί διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ ωμού κρέατος και λαχανικών κατά την προετοιμασία φαγητού (Anderson et al., 2004). Για το λόγο αυτό, η διασταυρούμενη επιμόλυνση μέσω διαφορετικών σεναρίων χειρισμού τροφίμων σε συνδυασμό με την επίδραση διαδικασιών καθαρισμού και απολύμανσης έχει προσδιοριστεί από αρκετές μελέτες (Chen et al., 2001, Moore et al., 2007, Ravishankar et al., 2010, Soares et al., 2012, Zhao et al., 1998, Zilelidou et al., 2015).

Σύμφωνα με τον CDC τουλάχιστον 95 επιδημίες σαλμονέλλωσης έχουν συνδεθεί με την κατανάλωση βόειου κρέατος από το 1973 έως το 2011, οδηγώντας σε 3643 επιβεβαιωμένα κρούσματα και 318 εισαγωγές στο νοσοκομείο (Laufer et al., 2015). Σε μια ανασκόπηση της συχνότητας και της συγκέντρωσης της *S. enterica* στην αλυσίδα παραγωγής βόειου κρέατος, το ποσοστό ανίχνευσης του παθογόνου σε σφάγια και σε ωμά βόεια προϊόντα ήταν 1,3 % και 3,8 %, αντίστοιχα (Rhoades et al., 2009). Παράλληλα, το ποσοστό των τροφιμογενών επιδημιών που οφείλονται σε επιμολυσμένα λαχανικά αυξάνεται παγκοσμίως (Lynch et al., 2009). Συγκεκριμένα, οι ντομάτες έχουν αναγνωριστεί ως φορέας μεταφοράς του παθογόνου σε αρκετές περιπτώσεις επιδημιών

σαλμονέλλωσης (Abadias et al., 2008, FDA, 2010, Sivapalasingam et al., 2004). Στις Η.Π.Α. από το 1973 έως το 2010, καταγράφηκαν 15 επιδημίες σαλμονελλώσεων που σχετιζόνταν με κατανάλωση ντομάτας, 12 εκ των οποίων έλαβαν χώρα έως το 2000 και είχαν ως αποτέλεσμα 2.000 επιβεβαιωμένα κρούσματα (FDA, 2010). Δεδομένου του συχτισμού της *S. enterica* με το βόειο κρέας και τις ντομάτες, όπως υποδεικνύεται από τη συχνότητα ανίχνευσης του παθογόνου και τα επιδημιολογικά δεδομένα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι ντομάτες καταναλώνονται συνήθως ωμές (π.χ. χωρίς θερμική επεξεργασία), η διασταυρούμενη επιμόλυνση τους από το ωμό βόειο κρέας είναι πιθανή.

Διάφορες πρακτικές και συμπεριφορές όσον αφορά τον χειρονακτικό καθαρισμό των επιφανειών όπου χειρίζονται τρόφιμα έχουν παρατηρηθεί μεταξύ ατόμων. Για παράδειγμα, η πλειοψηφία των καταναλωτών στη Γερμανία και το Ηνωμένο Βασίλειο χρησιμοποιεί τη μέθοδο του νεροχύτη (δηλαδή ο καθαρισμός των πιάτων γίνεται σε νεροχύτη γεμάτο με νερό και απορρυπαντικό), ενώ οι καταναλωτές της νοτιανατολικής Ευρώπης προτιμούν την άμεση μέθοδο καθαρισμού (δηλαδή κάτω από τρεχούμενο νερό) (Gilleíen et al., 2013, Shi et al., 2005). Η θερμοκρασία του νερού επίσης μπορεί να ποικίλει ανάμεσα τις χώρες, π.χ. οι Νορβηγοί χρησιμοποιούν αποκλειστικά ζεστό νερό για το πλύσιμο των πιάτων, ενώ οι Ιάπωνες χρησιμοποιούν ζεστό νερό το χειμώνα και κρύο το καλοκαίρι (Wilhite et al., 1996). Σύμφωνα με τις συστάσεις του CDC, οι επιφάνειες επαφής τροφίμων θα πρέπει να πλένονται με σαπούνι και θερμό, καθαρό νερό για την απομάκρυνση υπολλειμάτων τροφίμου κι εν συνεχεία να απολυμαίνονται για την αποτροπή διασποράς τροφιμογενών παθογόνων (CDC, 2008).

Σκοπός μελέτης

Σε συνέχεια των παραπάνω, ο προσδιορισμός της πιθανής μεταφοράς της *S. enterica* από ωμό κρέας σε λαχανικά μέσω οικιακού εξοπλισμού, απουσία ή παρουσία διαδικασιών καθαρισμού και απολύμανσης που συνήθως χρησιμοποιούνται από τους καταναλωτές στην Ελλάδα έχει ιδιαίτερη σημασία. Συνεπώς, ο σκοπός της μελέτης ήταν να εξεταστεί: (i) η μεταφορά του παθογόνου *S. Typhimurium* από ενοφθαλμισμένα βόεια φιλέτα σε ντομάτες μέσω επιφανειών πολυαιθυλενίου (ΠΕ), ξύλου (Ξ) και ανοξείδωτου χάλυβα (ΑΧ) χωρίς ενδιάμεσο καθαρισμό και (ii) η μεταφορά του παθογόνου όταν εφαρμόζονται 3 διαφορετικά σενάρια καθαρισμού κοινά σε οικιακό επίπεδο: ξέπλυμα

μόνο με νερό, πλύσιμο με νερό και σαπούνι και χρήση εμπορικού αντιβακτηριδιακού προϊόντος σε μορφή σπρέι.

Υλικά και μέθοδοι

Βακτηριακά στελέχη

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 3 στελέχη της *S. Typhimurium* (FMCC 137, 193, 194).

Επιφάνειες και δείγματα

Χρησιμοποιήθηκαν απολυμασμένες επιφάνειες επαφής τροφίμων (ΑΧ, ΠΑ, Ξ) και μαχαίρια ανοξείδωτου χάλυβα. Το εμβαδόν των επιφανειών που ερχόταν σε επαφή με τα τρόφιμα ήταν 25 cm² (5 X 5 cm) ενώ η αντίστοιχη επιφάνεια της λεπίδας του μαχαιριού ήταν 15 cm². Το βόειο κρέας αγοράστηκε από κρεοπωλείο και κόπηκε σε φιλέτα (5 X 5 cm). Οι ντομάτες προμηθεύτηκαν από λαχανοπωλείο πλύθηκαν εξωτερικά με ζεστό νερό βρύσης, ψεκάστηκαν με 100 % αιθανόλη και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα κόπηκαν σε οριζόντιες φέτες πάχους 1 cm και ακτίνας 2.5 cm που αντιστοιχούσαν σε επιφάνεια 15 cm².

Πειραματικός σχεδιασμός

Η άνω επιφάνεια των βόειων φιλέτων ενοφθαλμίστηκε με 200 μl 10⁷ CFU/ml, 3 στελεχών *S. Typhimurium* παρέχοντας πληθυσμό 10⁵ CFU/cm² και αφέθηκαν 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα, τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες κι έγιναν 4 κάθετες τομές με το μαχαίρι. Στην ίδια επιφάνεια κι αφού απομακρύνθηκαν τα βόεια φιλέτα και χωρίς να προηγηθεί ενδιάμεσος καθαρισμός, τοποθετήθηκαν οι φέτες ντομάτας στις οποίες έγιναν επίσης 4 κάθετες τομές. Επιπροσθέτως, εφαρμόστηκαν τρία σενάρια ενδιάμεσου καθαρισμού ή απολύμανσης του οικιακού εξοπλισμού: 1) με νερό βρύσης, 2) με νερό βρύσης σε συνδυασμό με υγρό απορρυπαντικό πιάτων και μηχανικό τρίψιμο 3) με ψεκάσμο απολυμαντικού εμπορικού σκευάσματος (Dettol Antibacterial

Surface Cleanser spray, Dettol). Στο πρώτο σενάριο, ο εξοπλισμός πλύθηκε με 3 L και 1 L νερού βρύσης για κάθε επιφάνεια και μαχαίρι, αντίστοιχα. Ομοίως, ο εξοπλισμός πλύθηκε με νερό και υγρό καθαρισμού πιάτων και τρίφτηκε με βούρτσα πλυσίματος πιάτων στο δεύτερο σενάριο καθαρισμού. Όσον αφορά το τελευταίο σενάριο καθαρισμού οι επιφάνειες και τα μαχαίρια ψεκάστηκαν με το απολυμαντικό και σκουπίστηκαν με χαρτί μετά από 1 min. Το απολυμαντικό που χρησιμοποιήθηκε περιείχε <5 % μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες και 0,074 g χλωριούχο βενζαλκόνιο (benzalkonium chloride) ανά 100 g.

Μικροβιακές αναλύσεις

Τα φιλέτα και οι ντομάτες μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε σακούλα stomacher που περιείχε αποστειρωμένο διάλυμα 1/4 Ringer και ομογενοποιήθηκαν για 1 min στο stomacher.

Ανάλυση δεδομένων

Κάθε πείραμα διεξήχθη εις διπλούν (2 διαφορετικές παρτίδες κρέατος) με 2 επαναλήψεις για κάθε περίπτωση. Οι δυο ανεξάρτητες μεταβλητές (είδος καθαρισμού, υλικό επιφάνειας) σε σχέση με τις εξαρτημένες μεταβλητή (πληθυσμός παθογόνων σε βόειο φιλέτο, επιφάνεια 1, μαχαίρι 1, ντομάτα, επιφάνεια 2, μαχαίρι 2) ελέγχθηκαν αν ακολουθούν την κανονική κατανομή σύμφωνα με το Shapiro-wilk test ($N < 50$). Οι δύο μεταβλητές δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή συνεπώς εφαρμόστηκαν μη παραμετρικά τεστ για το έλεγχο των στατιστικών υποθέσεων. Και για τις δυο μεταβλητές (είδος απολύμανσης, είδος επιφάνειας) που έχουν περισσότερες των 2 κατηγοριών εφαρμόστηκε ο έλεγχος Kruskal-Wallis και για τα κατά ζεύγη συγκρίσεις ο έλεγχος Dunn-Bonferroni.



Εικόνα 16. Πειραματικός σχεδιασμός 2^ο πειράματος

Αποτελέσματα και συζήτηση

Διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ βιοτικών και αβιοτικών επιφανειών χωρίς ενδιάμεσο καθαρισμό/ απολύμανση

Ο πληθυσμός της *S. Typhimurium* στα βόεια φιλέτα, στις ντομάτες, στις επιφάνειες και στα εργαλεία κοπής για όλα τα σενάρια καθαρισμού ή όχι του εξοπλισμού αναφέρεται στον **Πίνακα 9**. Ο πληθυσμός των βόειων φιλέτων ήταν περίπου $5 \log \text{CFU/g}$, ενώ στις ντομάτες μεταφέρθηκαν $3,99 \pm 0,13$, $3,65 \pm 0,30$ και $2,05 \pm 0,13 \log \text{CFU/g}$ για τις Ξ, ΑΧ και ΠΕ επιφάνειες, αντίστοιχα, όταν δεν εφαρμόστηκε κανενός είδους καθαρισμός (**Πίνακας 9**). Το επίπεδο επιμόλυνσης των αντίστοιχων επιφανειών πριν κοπούν οι ντομάτες ήταν $3,57 \pm 0,08$, $2,98 \pm 0,09$ και $2,63 \pm 0,18 \text{CFU/cm}^2$, αντίστοιχα. Έτσι, το χαμηλότερο και υψηλότερο επίπεδο μεταφοράς παρατηρήθηκαν στις επιφάνειες ΠΕ και Ξ, αντίστοιχα ($P < 0,05$). Σε συμφωνία με τα ευρήματά μας, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στους πληθυσμούς της *S. Enteritidis* που ανακτήθηκαν από επιφάνειες ΠΕ και ΑΧ, κατά την διάρκεια διασταυρούμενης επιμόλυνσης μεταξύ κοτόπουλου και ντομάτας (Soares et al., 2012). Αντίθετα, όμως με τη δική μας μελέτη, λιγότερα κύτταρα ανακτήθηκαν από τις Ξ επιφάνειες (Soares et al., 2012). Το είδος του ξύλου μπαμπού στη δικιά μας μελέτη, σε αντίθεση με πεύκο μπορεί να είναι η αιτία για διαφορετικά επίπεδα επιμόλυνσης αυτών των επιφανειών. Επίσης, σε αυτή τη μελέτη το τρίψιμο του δέρματος κοτόπουλου στις Ξ επιφάνειες σε αντίθεση με την απλή εναπόθεση στη δική μας μελέτη μπορεί να οδήγησε στην απορρόφηση των παθογόνων στους πόρους του ξύλου, με αποτέλεσμα τη χαμηλότερη ανάκτηση των παθογόνων από αυτές τις επιφάνειες.

Στις επιφάνειες ΑΧ και Ξ υψηλότερος αριθμός παθογόνων ανιχνεύθηκε στις ντομάτες σε σχέση με τις αντίστοιχες επιφάνειες επαφής. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε επίσης στη μεταφορά της *Salmonella* μέσω επιφανειών ΑΧ σε φέτες αγγουριού, αλλά όχι σε φιλέτα κοτόπουλου (Kusumaningrum, 2003). Η υψηλή υγρασία της επιφάνειας της ντομάτας πιθανόν να διευκολύνει την αποκόλληση των παθογόνων από τους πάγκους κοπής. Επιπλέον, το Ξ και ο ΑΧ είναι υδρόφιλες επιφάνειες κι έτσι πιθανόν να προάγουν τη μεταφορά των παθογόνων σε επιφάνειες με αυξημένη υγρασία όπως οι ντομάτες. Όσον αφορά τα μαχαίρια, τόσο μετά την κοπή του βόειου κρέατος, όσο και μετά την κοπή της ντομάτας παρόμοιοι πληθυσμοί ανακτήθηκαν, ανεξαρτήτως υλικού της επιφάνειας κοπής ($P > 0,05$).

Πίνακας 9. Πληθυσμός του παθογόνου *S. enterica* Typhimurium σε (1) βόεια φιλέτα επιμολυσμένα με το παθογόνο (ΒΦ), (2) επιφάνεια κοπής μετά την επαφή με το βόειο φιλέτο (ΕΚΒ), (3) το μαχαίρι κοπής του βόειου φιλέτου (ΜΒ), (4) η ντομάτα που ήρθε σε επαφή με την ίδια επιφάνεια (Το), (5) η επιφάνεια κοπής μετά την επαφή με την ντομάτα (ΕΚΤ) και (6) το μαχαίρι κοπής της ντομάτας (ΜΤ). Μελετήθηκαν τρεις τύποι πάγκων κοπής (ξύλο, ΞΥ, πολυαιθυλένιο, ΠΕ, ανοξείδωτος χάλυβας, ΑΧ) και τέσσερα διαφορετικά σενάρια καθαρισμού/απολύμανσης (μη καθαρισμός (ΧΚ), Καθαρισμός μόνο με νερό (ΚΝ), καθαρισμός με νερό και σαπούνι (ΚΣ) και χρήση απολυμαντικού σπρέι (ΑΣ))

Είδος καθαρισμού/ απολύμανσης	Είδος επιφάνειας	ΒΦ	ΕΚΒ	ΜΒ	Το	ΕΚΤ	ΜΤ
ΧΚ	ΠΕ	4,90±0,07 ^{a1ΑΣ}	2,63±0,18 ^{ab}	0,92±0,19 ^{aA}	2,05±0,13 ^{ab}	1,55±0,16 ^{ab}	0,54±0,12 ^{aA}
	ΑΧ	5,21±0,28 ^{aA}	2,98±0,09 ^{aAB}	0,45±0,31 ^{aA}	3,65±0,30 ^{aAB}	2,18±0,11 ^{aAB}	0,89±0,48 ^{aA}
	ΞΥ	5,12±0,13 ^{aA}	3,57±0,08 ^{aA}	1,13±0,50 ^{aA}	3,99±0,13 ^{aA}	3,24±0,04 ^{aA}	0,53±0,30 ^{abA}
ΚΝ	ΠΕ	5,12±0,21 ^{aA}	1,01±0,36 ^{abB}	0 ^{bA}	0,8±0,18 ^{abA}	0 ^{bB}	0 ^{bB}
	ΑΧ	5,21±0,11 ^{aA}	0,71±0,32 ^{abB}	0 ^{bA}	1,59±0,43 ^{abA}	0,79±0,28 ^{abAB}	0 ^{bB}
	ΞΥ	5,10±0,06 ^{aA}	2,55±0,12 ^{abA}	0,25±0,18 ^{aA}	2,22±0,22 ^{bA}	2,61±0,14 ^{abA}	0,70±0,18 ^{aA}
ΚΣ	ΠΕ	4,99±0,11 ^{aA}	0 ^{bB}	0 ^{bA}	0,45±0,04 ^{bAB}	0 ^{bB}	0 ^{bA}
	ΑΧ	5,05±0,06 ^{aA}	0 ^{bB}	0 ^{bA}	0 ^{bB}	0 ^{bB}	0 ^{bA}
	ΞΥ	5,00±0,10 ^{aA}	1,50±0,52 ^{bA}	0 ^{aA}	2,14±0,19 ^{bA}	1,41±0,19 ^{bA}	0 ^{bA}
ΑΣ	ΠΕ	5,00±0,14 ^{aA}	0 ^{bB}	0 ^{bA}	0,83±0,18 ^{abAB}	0 ^{bB}	0 ^{bA}
	ΑΧ	5,09±0,06 ^{aA}	0 ^{bB}	0 ^{bA}	0 ^{bB}	0 ^{bB}	0 ^{bA}
	ΞΥ	5,07±0,11 ^{aA}	2,48±0,23 ^{abA}	0 ^{aA}	2,95±0,10 ^{abA}	2,29±0,13 ^{abA}	0 ^{abA}

Οι τιμές αφορούν τους μέσους όρους (4 επαναλήψεων) ± τυπική απόκλιση που εκφράζεται σε log CFU/g για τα βόεια φιλέτα και τις ντομάτες και σε log CFU/cm² για τις επιφάνειες και τα μαχαίρια. ¹ Διαφορετικά πεζά γράμματα (a,b) αναφέρονται σε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των σεναρίων καθαρισμού/ απολύμανσης για το ίδιο είδος υλικού των επιφανειών ($P < 0,05$). ² Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα (A,B) αναφέρονται σε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του υλικού των επιφανειών για το ίδιο είδος καθαρισμού/ απολύμανσης ($P < 0,05$)

Αποτελεσματικότητα καθαρισμού επιφανειών και μαχαιριών με νερό

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από το 2^ο χειρισμό έδειξαν ότι το ξέπλυμα με νερό περιόρισε σημαντικά ($P < 0,05$) τον πληθυσμό της *S. Typhimurium* τόσο στις επιφάνειες (ΠΕ, ΑΧ) όσο και στις ντομάτες. Κατά προσέγγιση μείωση 1 log, 2 log, 1,5 log CFU/cm² παρατηρήθηκε στις Ξ, ΑΧ και ΠΕ επιφάνειες, ενώ ο πληθυσμός των μαχαιριών ήταν κάτω του ορίου αριθμησης. Παρόμοια με τη μελέτη μας, το ξέπλυμα με νερό απομάκρυνε τα παθογόνα *E. coli* O157:H7 και *S. Typhimurium* από την πλαστική επιφάνεια, αλλά όχι από την ξύλινη (Abrishami et al., 1994, Gough & Dodd, 1998). Μια άλλη μελέτη επίσης ανέφερε ότι ο καθαρισμός μόνο με νερό δεν είναι η κατάλληλη μέθοδος καθαρισμού πάγκων κοπής καθότι αν και τα παθογόνα ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης, όλα τα δείγματα ήταν θετικά μετά από εμπλουτισμό (100 %) (Soares et al., 2012). Ομοίως με αυτή τη διαδικασία καθαρισμού ανακτήθηκαν χαμηλοί πληθυσμοί *S. Newport* ($0,50 \pm 0,33$ CFU/cm²) σε πλαστικές επιφάνειες που είχαν επιμολυνθεί με κοτόπουλο με αρχικό πληθυσμό παρόμοιο με τη δική μας μελέτη ($4,98 \pm 0,04$ CFU/g) (Ravishankar et al., 2010).

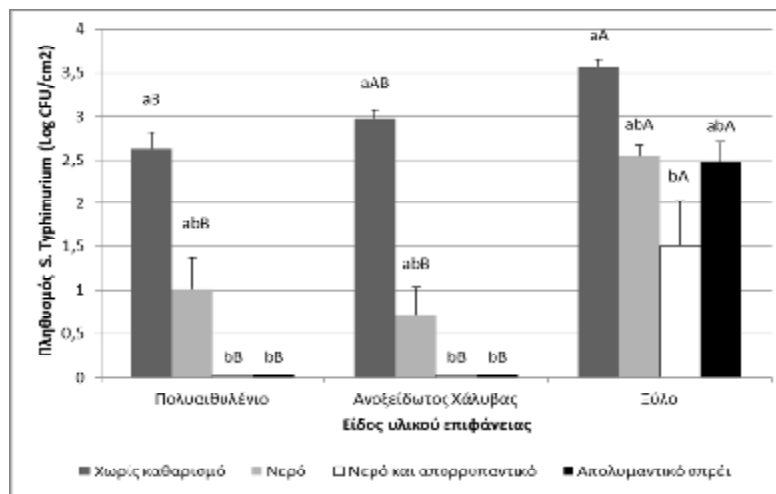
Αποτελεσματικότητα μηχανικού καθαρισμού επιφανειών και μαχαιριών με νερό και απορρυπαντικό

Το τρίψιμο των επιφανειών με υγρό απορρυπαντικό πιάτων και το ξέπλυμα με κρύο νερό οδήγησε σε μείωση κατά προσέγγιση 3 log του πληθυσμού του παθογόνου από τις επιφάνειες ΑΧ και ΠΕ, ενώ από τις Ξ επιφάνειες ανακτήθηκε 1,5 log/cm². Ο ΑΧ εμφάνισε το χαμηλότερο ποσοστό των θετικών δειγμάτων κι έτσι επιβεβαιώνεται η άποψη πολλών ερευνητών που το θεωρούν ως το ασφαλέστερο υλικό σε σχέση με την ευκολία καθαρισμού (Soares et al., 2012). Το πλύσιμο με νερό και απορρυπαντικό, αν και δεν ήταν η κατάλληλη μέθοδος καθαρισμού για την Ξ επιφάνεια, ήταν ο πιο αποτελεσματικός τρόπος περιορισμού του πληθυσμού του παθογόνου ($P < 0,05$) (**Διάγραμμα 32**). Η άποψη ότι οι ξύλινες επιφάνειες είναι πιο δύσκολες για να απολυμανθούν έχει επίσης αναφερθεί (Thormar & Hilmarsson, 2010). Ο μηχανικός καθαρισμός θεωρείται ως ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αποκόλλησης των προσκολλημένων κυττάρων από τις επιφάνειες (Gibson et al., 1999). Στο πλαίσιο αυτό και ο CDC συνιστά το πλύσιμο των επιφανειών,

όπου έχουν τοποθετηθεί ωμά τρόφιμα, με νερό και σαπούνι ως προαπαιτούμενο στάδιο μείζονος σημασίας για τον επαρκή καθαρισμό τους (CDC, 2008).

Αποτελεσματικότητα απολύμανσης επιφανειών και μαχαιριών με αντιβακτηριδιακό σπρέι

Το αντιβακτηριδιακό σπρέι βρέθηκε ως αποτελεσματικός τρόπος για τον καθαρισμό των επιφανειών ΑΧ και ΠΕ, ωστόσο επίσης δεν ήταν αποτελεσματικός στη μείωση των παθογόνων στις Ξ επιφάνειες (Διάγραμμα 32). Το ίδιο αντιβακτηριδιακό σπρέι φάνηκε να περιορίζει τα παθογόνα *E. coli* και *S. aureus* σε πλαστικές και ξύλινες επιφάνειες, χωρίς υπολείμματα τροφών, όταν το αρχικό ενοφθάλμισμα ήταν 2,5 log CFU/cm² (DeVere & Purchase, 2007). Στη δική μας μελέτη το υψηλότερο επίπεδο επιβίωσης της *S. Typhimurium* στις Ξ επιφάνειες μπορεί να εξηγηθεί λόγω του υψηλότερου αρχικού ενοφθαλμίσματος και των υπολειμμάτων τροφής στις επιφάνειες που πιθανόν να είχαν προστατευτική δράση υπέρ των παθογόνων.



Διάγραμμα 32. Πληθυσμός *S. Typhimurium* στις επιφάνειες κοπής (πολυαιθυλένιο, ανοξείδωτος χάλυβας και ξύλο) όπου τεμαχίστηκε το βόειο κρέας (ΕΚΒ), χωρίς ενδιάμεσο καθαρισμό και με εφαρμογή 3 σεναρίων καθαρισμού (με νερό, με νερό και απορρυπαντικό, με απολυμαντικό σπρέι).

Διαφορετικά πεζά γράμματα (a,b) αναφέρονται σε στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ των σεναρίων καθαρισμού/ απολύμανσης για το ίδιο είδος υλικού των επιφανειών ($P < 0,05$). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα (A,B) αναφέρονται σε στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ του υλικού των επιφανειών για το ίδιο είδος καθαρισμού/ απολύμανσης ($P < 0,05$).

Για τα δείγματα όπου τα παθογόνα ήταν κάτω από το όριο αρίθμησης, εφαρμόστηκε εμπλουτισμός και εκλεκτική απομόνωση με Rappaport - Vassiliadis Broth και το ποσοστό των θετικών δειγμάτων αναφέρεται στον **Πίνακα 10**. Γενικά, οι επιφάνειες ήταν όλες θετικές μετά τον εμπλουτισμό, ενώ τα μαχαίρια ήταν στην πλειοψηφία τους αρνητικά. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω του υλικού AX που ήταν εύκολο στο καθάρισμα αλλά και λόγω της κάθετης επαφής κατά τον τεμαχισμό με το επιμολυσμένο κρέας και μικρότερου επιπέδου μεταφοράς παθογόνων.

Πίνακας 10. Ποσοστό (%) των θετικών επιφανειών και μαχαιριών στις οποίες ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο αρίθμησης (εμπλουτισμός με Rappaport- Vasiliadis Broth)

	MB			MT			EKB			EKT		
	ΠΕ	ΑΧ	ΞΥ	ΠΕ	ΑΧ	ΞΥ	ΠΕ	ΑΧ	ΞΥ	ΠΕ	ΑΧ	ΞΥ
Χωρίς καθαρισμό	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Μόνο με νερό	33,3	25	100	65	50	100	100	100	100	100	100	100
Νερό και απορρυπαντικό	66,6	0	33,3	0	0	100	100	75	100	0	0	100
Απολυμαντικό σπρέι	33,3	25	0	0	0	100	33,5	25	100	66,6	50	100

*Το μαχαίρι μετά την κοπή του βόειου φιλέτου (MB), το μαχαίρι μετά την κοπή της ντομάτας (MT), η επιφάνεια κοπής μετά την επαφή με το βόειο φιλέτο (EKB) και η επιφάνεια κοπής μετά την επαφή με τη ντομάτα (EKT).

Επίπεδα μεταφοράς (%)

Όσον αφορά τα επίπεδα μεταφοράς (%) για τη *S. Typhimurium* υπολογίστηκαν από το βόειο φιλέτο στον πάγκο κοπής και από τον πάγκο κοπής στην ντομάτα και μόνο στις περιπτώσεις που ο πληθυσμός των παθογόνων ήταν άνω του ορίου αρίθμησης (**Πίνακας 11**). Σε αυτή τη μελέτη η *S. Typhimurium* μεταφέρθηκε σε ποσοστό $0,45 \pm 0,006$, $0,58 \pm 0,01$ και $1,57 \pm 0,01$ από τα βόεια φιλέτα στις επιφάνειες ΑΧ, ΠΕ, Ξ και $0,09 \pm 0,009$, $0,02 \pm 0,002$, $0,13 \pm 0,0001$ όταν οι ίδιες επιφάνειες καθαρίστηκαν με τη χρήση μόνο νερού. Παρόμοια αποτελέσματα ($1,25 \pm 0,09$ % και $0,05 \pm 0,05$ %) λήφθηκαν από άλλη μελέτη όσον αφορά τη μεταφορά σε πλαστικές επιφάνειες της *Salmonella* Newport από φιλέτο κοτόπουλου (Ravishankar et al., 2010). Όσον αφορά τη μεταφορά από ΠΕ επιφάνεια στις ντομάτες ήταν $26,92 \pm 0,27$ % και $37,9 \pm 0,39$ % για το πρώτο και το

δεύτερο σενάριο. Η επίστρωση (condition film) από τον ωπό του κρέατος σε συνδυασμό με το νερό μπορεί να μετάβαλλε τη φύση του ΠΕ από υδρόφοβο σε υδρόφιλο κι έτσι να αύξησε το επίπεδο μεταφοράς (Midelet & Carpentier, 2002). Το υψηλότερο ποσοστό μεταφοράς παρατηρήθηκε στην επιφάνεια του ΑΧ προς τις ντομάτες και αντιστοιχούσε στο $86,98 \pm 0,75$ % και όταν η επιφάνεια καθαρίστηκε με νερό στο $92,13 \pm 0,92$ %. Υψηλά ποσοστά μεταφοράς *S. Typhimurium* παρατηρήθηκαν επίσης από επιφάνειες ΑΧ σε φέτες αγγουριού, υποδεικνύοντας ότι αν και ο ΑΧ είναι εύκολος στον καθαρισμό μπορεί να διευκολύνει την απελευθέρωση παθογόνων κατά τη διάρκεια χειρισμού τροφίμων (Moore et al., 2007).

Πίνακας 11. Επίπεδα μεταφοράς της *S. Typhimurium* (%) από τα βόεια φιλέτα (ΒΦ) στις επιφάνειες κοπής (ΕΚ) και από αυτές στη ντομάτα (Το), χωρίς ενδιάμεσο καθαρισμό και με καθαρισμό με νερό των επιφανειών πολυαιθυλενίου (ΠΕ), ανοξείδωτου χάλυβα (ΑΧ) και ξύλου (ΞΥ)

		από ΒΦ σε ΕΚ	από ΕΚ σε Το
Χωρίς καθαρισμό	ΠΕ	$0,58 \pm 0,01$	$26,92 \pm 0,27$
	ΑΧ	$0,45 \pm 0,006$	$86,98 \pm 0,75$
	ΞΥ	$1,57 \pm 0,01$	$81,98 \pm 0,86$
Καθαρισμός μόνο με νερό	ΠΕ	$0,02 \pm 0,002$	$37,90 \pm 0,39$
	ΑΧ	$0,09 \pm 0,009$	$92,13 \pm 0,92$
	ΞΥ	$0,13 \pm 0,001$	$52,08 \pm 0,66$

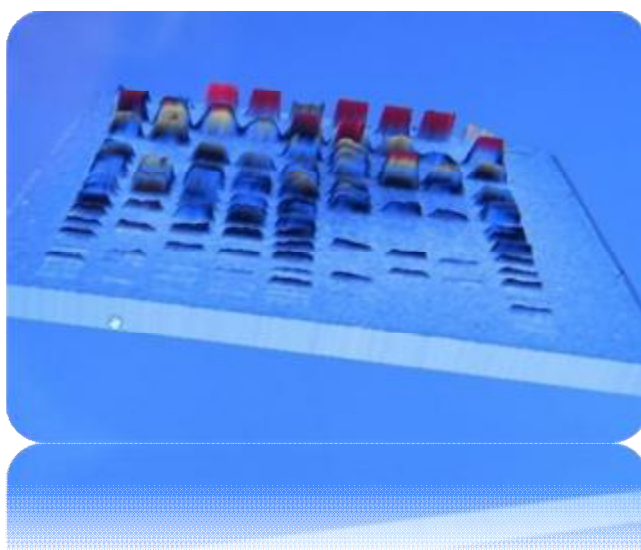
Διαφορετικά επίπεδα μεταφοράς της *S. Enteritidis* από επιφάνειες ΑΧ σε αγγούρι 65 ± 21 % και ψημένα φιλέτα κοτόπουλου 49 ± 21 % έχουν επίσης καταγραφεί κι ως αιτία θεωρήθηκαν τα διαφορετικά ποσοστά υγρασίας και λίπους (Kusumaningrum, 2003). Αυτή η άποψη μπορεί να εξηγήσει την ομοιότητα σε επίπεδο μεταφοράς του αγγουριού και της ντομάτας. Όταν οι επιφάνειες ΑΧ και ΠΕ ξεπλύθηκαν με νερό παρατηρήθηκε μια αύξηση στο επίπεδο μεταφοράς, πιθανόν λόγω αυξημένης υγρασίας και εξασθένησης της προσκόλλησης του παθογόνου στις επιφάνειες, με αποτελέσματα την αύξηση του πληθυσμού στις ντομάτες. Εν αντιθέσει, στις Ξ επιφάνειες το επίπεδο μεταφοράς από επιφάνειες στην ντομάτα μειώθηκε από $81,98 \pm 0,86$ % σε $52,08 \pm 0,66$ %, αντίστοιχα. Η σημαντική μείωση στις επιφάνειες που ξεπλύθηκαν με νερό πιθανόν οφείλεται στη διείδυση των βακτηρίων με τη βοήθεια του νερού στους πόρους του ξύλου, γεγονός που

καθιστά πιο δύσκολη την ανάκτησή τους. Η διείσδυση των βακτηριών σε τέτοιου είδους υλικό επιφάνειας αφορά κυρίως τα 2-3 mm, σύμφωνα με μια μελέτη που αφορά ξύλινα ράφια που χρησιμοποιήθηκαν για ωρίμανση τυριών (Mariani et al., 2007). Ομοίως, σε άλλη μελέτη το επίπεδο μεταφοράς των βακτηρίων φαίνεται να επηρεάζεται από τις επιφάνειες που εμπλέκονται στη διασταυρούμενη επιμόλυνση (Chen et al., 2001).

Συμπεράσματα

Ο ενδιάμεσος ενδεδειγμένος καθαρισμός των επιφανειών φάνηκε να κατέχει σημαντικό ρόλο στη πρόληψη της διασταυρούμενης επιμόλυνσης, ακόμη και κατά τη διάρκεια προετοιμασίας γεύματος που συμπεριλαμβάνει ωμό κρέας και λαχανικά. Το πλύσιμο μόνο με νερό αναμφίβολα μειώνει το βακτηριακό φορτίο, αλλά όχι σε ασφαλή επίπεδα. Αντιθέτως, το πλύσιμο με νερό βρύσης σε συνδυασμό με υγρό πιάτων ή η χρήση απολυμαντικού σπρέι αποδείχθηκε αποτελεσματική, μειώνοντας αποτελεσματικά τη διασταυρούμενη επιμόλυνση μεταξύ επιμολυσμένου κρέατος και ντομάτας, τουλάχιστον όσο αφορά τις επιφάνειες του ΑΧ και του ΠΕ. Οι επιφάνειες ΑΧ και τα μαχαίρια ήταν τα πιο εύκολα να καθαριστούν σε όλες τις περιπτώσεις. Ωστόσο, όλα τα σενάρια καθαρισμού ήταν ανεπαρκή στην πρόληψη της διασταυρούμενης επιμόλυνσης στις Ξ επιφάνειες. Οι ξύλινες επιφάνειες ήταν πιο δύσκολο να καθαριστούν/απολυμανθούν, συνεπώς η χρήση τους θα πρέπει να αποφεύγεται. Συνεπώς, σε περιπτώσεις ανεπαρκών διαδικασιών καθαρισμού/ απολύμανσης, η χρήση διαφορετικών πάγκων κοπής και μαχαιριών κατά το χειρισμό ωμού κρέατος και λαχανικών, πιθανόν να είναι η πιο ασφαλής προσέγγιση για την πρόληψη της διασταυρούμενης επιμόλυνσης και τροφιμογενών λοιμώξεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Ανάπτυξη βιοϋμενίου μονο-καλλιεργειών και μικτών καλλιεργειών *S. Typhimurium* και *S. aureus*. Μελέτη της αντιβακτηριακής επίδρασης κοινών απολυμαντικών στα βιοϋμένια και προσδιορισμός του κάθε στελέχους με PFGE

Εισαγωγή

Η *S. enterica* και ο *S. aureus* έχουν την ικανότητα να προσκολλούνται στις επιφάνειες και να σχηματίζουν βιοϋμένια, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα προσαρμογής και επιβίωσης σε ένα περιβάλλον στρεσογόνο, όπως αυτό των χώρων επεξεργασίας τροφίμων (Giaouris et al., 2013, Kumar & Anand, 1998). Η μελέτη προσκολλημένων κυττάρων που αποτελούνται από μικτά είδη βακτηρίων έχει βελτιώσει την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων και διαδικασιών που επισυμβαίνουν κατά τη διάρκεια σχηματισμού μικτών βιοϋμενίων σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων. Για παράδειγμα, οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται κατά το στάδιο της μικροβιακής προσκόλλησης προσδιορίζουν την δομή της αρχικής κοινότητας, ενώ καθώς ο σχηματισμός του βιοϋμενίου συνεχίζεται, σταθεροποιώντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο πάχος και σταθερότητα, επηρεάζοντας έτσι την αρχιτεκτονική δομή και τη φυσιολογία του βιοϋμενίου.

Προφανώς, τα μικτά βιοϋμένια αποτελούν δυναμικές κοινότητες με εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ειδών και στελεχών που πιθανόν να έχουν επίδραση στη δομή, τη σύσταση, τη δυναμική του πληθυσμού (π.χ. ποιο στέλεχος επικρατεί) και τη φυσιολογία (π.χ. ανθεκτικότητα σε απολυμαντικά) (Giaouris et al., 2013). Συνεπώς, οι πολύπλοκες μεσοκυττάρια αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα τόσο εντός όσο και μεταξύ των ειδών μπορεί να είναι ανταγωνιστικές, συνεργατικές ή ακόμα και ουδέτερες, ανάλογα με τα μικροβιακά είδη συμμετέχουν και τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες στη συγκεκριμένη θέση (Elias & Banin, 2012; Giaouris et al., 2015; Rendueles & Ghigo, 2012).

Σε περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων, διάφορα είδη μικροοργανισμών μπορεί να προσκολληθούν, να επιβιώσουν, να πολλαπλασιαστούν και να σχηματίσουν βιοϋμένια και με αυτό τον τρόπο προστατεύονται και αποκτούν ανθεκτικότητα σε υπο-θανάτιες συγκεντρώσεις απολυμαντικών (Jahid & Ha, 2014). Αρκετές μελέτες έχουν προσδιορίσει την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών έναντι στη *Salmonella* spp. σε μικτά βιοϋμένια με *P. fluorescens* (Leriche & Carpentier, 1995), *E. coli* O157:H7 (Wang et al.,

2013) ή *L. monocytogenes* (Kostaki et al., 2012) και σε βιοϋμένια που αποτελούνταν επιπλέον από *Staphylococcus simulans*, *Lactobacillus fermentum*, *P. putida* και *L. monocytogenes* (Chorianopoulos et al., 2008). Πρόσφατες μελέτες έχουν επίσης προσδιορίσει την αντοχή των βιοϋμενίων του *S. aureus* ως προς τα χημικά απολυμαντικά σε μικτά βιοϋμένια με τον *Bacillus subtilis* (Bridier et al., 2012), σε συγκαλλιέργεια με την *Candida albicans* και την *Pseudomonas aeruginosa* (Kart et al., 2014) ή με τον *Streptococcus mutants* και την *P. aeruginosa* (Baffone et al., 2011). Περιορισμένες πληροφορίες υπάρχουν σχετικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών και ειδών στα μικτά βιοϋμένια αλλά και αναφορικά με το πως αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα κοινών απολυμαντικών που χρησιμοποιούνται σε περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Μελέτες που διερευνούν το σχηματισμό μονών/ μικτών βιοϋμενίων και την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών ενάντια σε αυτά (μετασχηματισμός από Sanchez-Vizuet et al., 2015)

Είδος απολυμαντικού(συγκέντρωση)	Είδη βακτηρίων	Συνθήκες βιοϋμενίου	σχηματισμού	Βιβλιογραφία
Υπεροξικό οξύ	<i>Listeria innocua</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Κουπόνια ανοξειδωτού γάλυβα		Bourion & Cerf (1996)
Υπεροξικό οξύ (3500 ppm) για 5 min	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i>	Μικροπλακίδια πολυστυρενίου		Bridier et al. (2012)
Χλωρίνη (22 mg/ml)	<i>Kocuria sp.</i> , <i>Brevibacterium linens</i> , <i>S. sciuri</i>	Κουπόνια ανοξειδωτού γάλυβα		Leriche et al. (2003)
Χλωρίνη	9 drinking water system flora, <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>E. cloacae</i>	Συσκευή βιοϋμενίου Calgary	σχηματισμού	Schwering et al. (2013)
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (50ppm), Υποχλωριώδες νάτριο (10ppm), Υπεροξικό οξύ (10ppm) για 6 min	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. enterica</i>	Μικροπλακίδια πολυστυρενίου Κουπόνια ανοξειδωτού γάλυβα		Kostaki et al., 2012
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (2.5, 5, 10, 17, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 mg/ l), υπεροξικό οξύ (1, 2.5, 5, 10, 17, 25, 50, 100, 250, 500 mg/ l) για 10 min	<i>L. monocytogenes</i>	Κουπόνια ανοξειδωτού γάλυβα & πολυπροπυλενίου		Saá Ibusquiza et al. (2011)
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (2.5, 5, 10, 17, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 mg/ l) για 10 min	<i>L. monocytogenes</i> , <i>P. putida</i>	Κουπόνια ανοξειδωτού γάλυβα & πολυπροπυλενίου		Saá Ibusquiza et al. (2012)

Χλωρίνη	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i>	Μικροπλακίδια πολυστευρενίου	Wang et al. (2013)
Χλωρίνη	<i>S. Typhimurium</i> , <i>P. fluorescens</i>	Κουπόνια πολυκαρβονικά	Leriche & Carpentier (1995)
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (50, 100 µg/ml) Υπεροξικό οξύ (50, 100 µg/ml) για 15 min	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Μικροπλακίδια πολυστευρενίου	van der Veen & Abee (2011)
Χλωριούχο βενζαλκόνιο (50 ppm)	<i>P. putida</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα	Giaouris et al. (2013)
Υποχλωριώδες νάτριο (0.1, 0.5, 1, 10 mg/l) για 1h	<i>A. calcoaceticus</i> , <i>B. ceracia</i> , <i>Methylobacterium</i> sp., <i>Mycobacterium mucogenicum</i> , <i>Sphingomonas capsulata</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	Μικροπλακίδια πολυστευρενίου	Chaves Simões et al. (2010)
Τεταρτοταγείς βάσεις αμμωνίου (1 %), χλωρίνη (0.465 %), υπεροξικό οξύ (2 %)	<i>L. monocytogenes</i>	Κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα	Belessi et al., 2011

Σκοπός μελέτης

Συνεπώς, η αλληλεπίδραση σε επίπεδο είδους ή/και στελέχους σε ώριμο βιοϋμένιο που αποτελείται από *S. Typhimurium* και *S. aureus* (3 στελέχη ανά είδος), υπό συνθήκες μόνης ή μικτής καλλιέργειας σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα αποτιμήθηκε. Επιπλέον, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα διαφορετικών απολυμαντικών (χλωριούχο βενζαλκόνιο BC, υπεροξικό οξύ PA και υποχλωριώδες νάτριο SH) στην καταπολέμηση του ώριμου βιοϋμένιου. Για το σκοπό αυτό, ώριμο βιοϋμένιο (επώαση για 6 ημέρες στους 20 °C) εκτέθηκε σε υποθανάτιες συγκεντρώσεις BC (50ppm), PA (10 ppm) και SH (10 ppm) για 6 min. Παράλληλα εξετάστηκε η επικράτηση του κάθε στελέχους στο βιοϋμένιο πριν και μετά την απολύμανση με την τεχνική PFGE.

Υλικά και μέθοδοι

Βακτηριακά στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν 3 στελέχη *S. Typhimurium* (FMCC B-137, 193, 410) και 3 στελέχη *S. aureus* (FMCC B-415, 134, 135) ώστε να γίνουν μονοκαλλιέργειες ή μικτές καλλιέργειες για το σχηματισμό βιοϋμένιων. Το στέλεχος *S. Typhimurium* FMCC B-137

είναι πολυανθεκτικό στα αντιβιοτικά και το στελέχος *S. aureus* FMCC B-415 είναι ανθεκτικό στη μεθικιλίνη .

Σχηματισμός βιοϋμενίων

Χρησιμοποιήθηκαν επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα διαστάσεων 3 cm x 1 cm x 0,1 cm, οι οποίες τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε κοντούς δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 4,5 ml ή 4 ml Ο Ringer. Εν συνεχεία ενοφθαλμίστηκαν με 0,5 ml από τα 3 στελέχη *S. Typhimurium* ή/και *S. aureus* για τις μόνο- ή τις μικτές καλλιέργειες (10^6 CFU/ml). Τα δείγματα επωάστηκαν για 3 h στους 15 °C κι έπειτα για 6 μέρες στους 20 °C σε 5 ml TSB, το οποίο ανανεωνόταν ανά 48 h.

Απολύμανση βιοϋμενίων

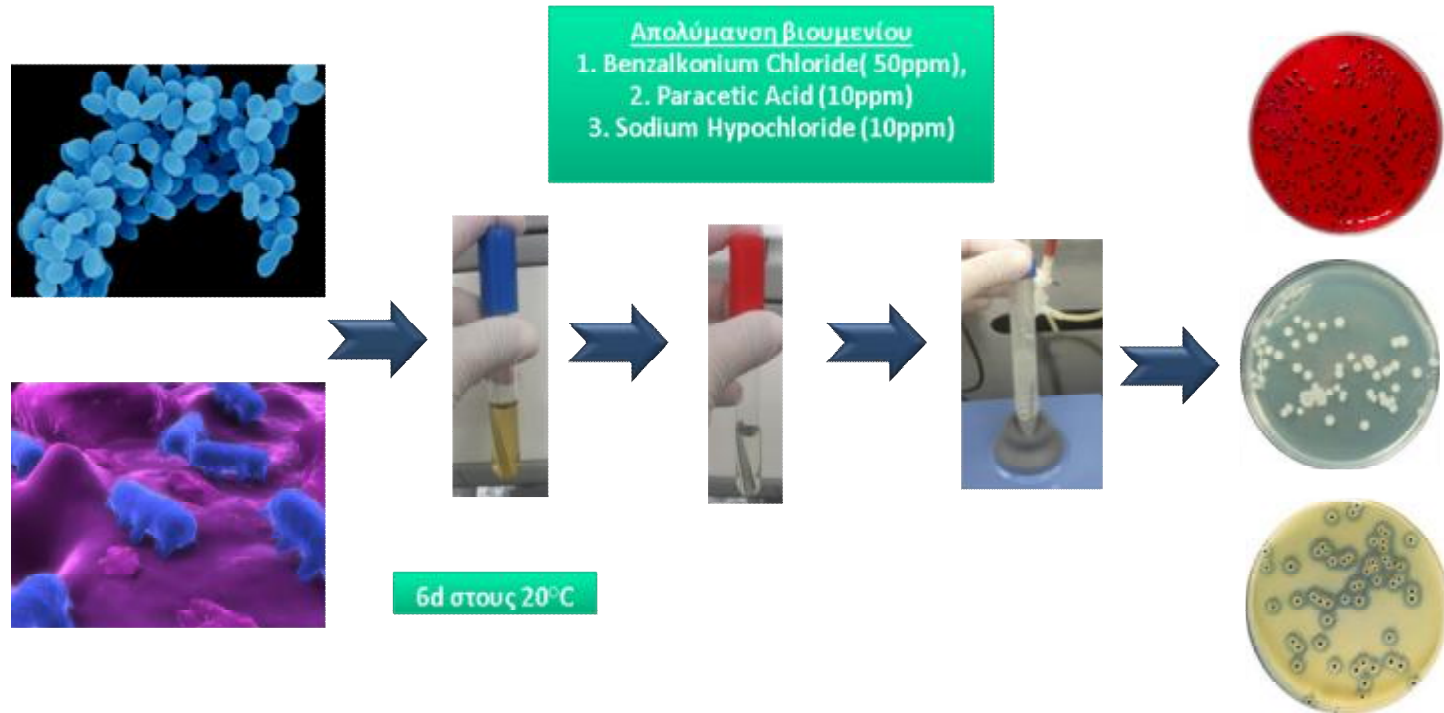
Μετά τις 6 μέρες στα κουπόνια εφαρμόστηκε απολύμανση σε 5 ml BC (50ppm) ή PA (10ppm) ή SH (10ppm), δυο πρότυπα (control) εμβάπτιση ή όχι του κουπονιού σε αποστειρωμένο νερό για 6 min. Ακολούθησε εξουδετέρωση του απολυμαντικού με μεταφορά και εμβάπτιση των κουπονιών σε 6 ml στείρου διαλύματος εξουδετέρωσης Dey Engley Neutralizing Broth για 10 min.

Ποσοτικοποίηση βιοϋμενίου

Η ποσοτικοποίηση του βιοϋμενίου με ή χωρίς απολύμανση έγινε τη μέθοδο του στροβιλισμού με σφαιρίδια. Όσον αφορά τις μονοκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα το TSA για την ποσοτικοποίηση του βιοϋμενίου. Στις μικτές καλλιέργειες εκτός του TSA, για τα στελέχη *S. Typhimurium* χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα το XLD και για τα στελέχη του *S. aureus* το BP.

Ηλεκτροφόρηση Εναλλασσόμενου Ηλεκτρικού Πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)

Η τεχνική που ακολουθήθηκε για τις απομονώσεις των στελεχών της *S. Typhimurium* περιγράφεται αναλυτικά στην εισαγωγή (βλέπε ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2).



Εικόνα 17. Πειραματικός σχεδιασμός 3^{ου} πειράματος

Ανάλυση δεδομένων

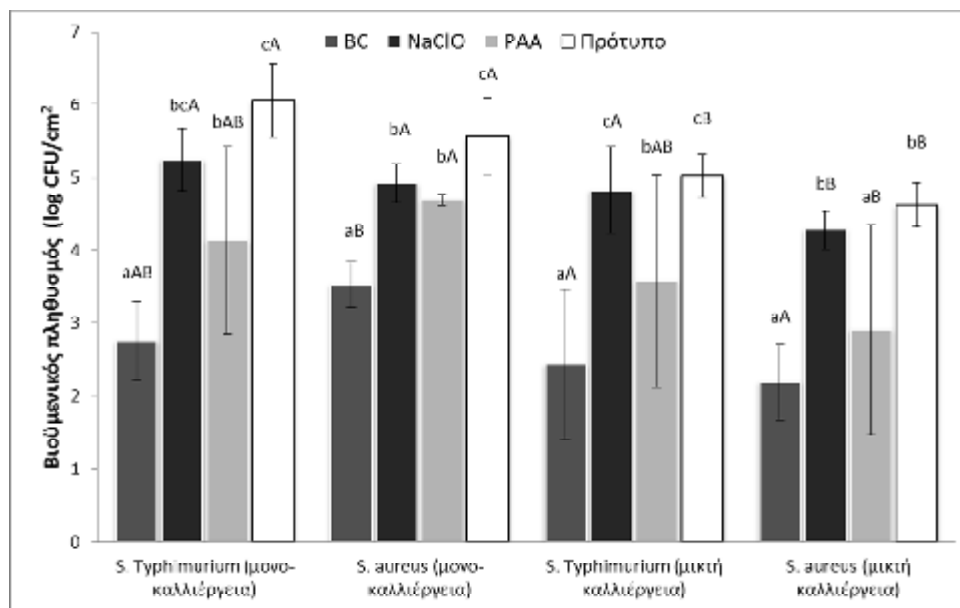
Κάθε πείραμα διεξήχθη εις διπλούν με 3 επαναλήψεις για κάθε περίπτωση. Οι 2 ανεξάρτητες μεταβλητές (είδος απολύμανσης, είδος καλλιέργειας) σε σχέση με την εξαρτημένη μεταβλητή (πληθυσμός βιοϋμενίου παθογόνου) έλεγχθηκαν αν ακολουθούν την κανονική κατανομή σύμφωνα με το Shaphiro-wilk test ($N < 50$). Η μεταβλητή «είδος απολύμανσης» ακολουθεί την κανονική κατανομή συνεπώς εφαρμόστηκαν παραμετρικά τεστ. Η διασπορά των ομάδων είναι ανομοιογενής, σύμφωνα με τον έλεγχο του Levene ($4, 145$)=0.00, βασισμένος στο μέσο όρο. Για τον προσδιορισμό της ύπαρξης ή όχι διαφορών των μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε ο παραμετρικός έλεγχος one-way ANOVA. Για να εξακριβώσουμε μεταξύ ποιων ομάδων οφείλονται οι διαφορές χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Post-hoc (κατά ζεύγη) σύμφωνα με τη μέθοδο Tamhane's T2, η οποία χρησιμοποιεί την t κατανομή και βασίζεται στο κριτήριο Sidak για να διορθώσει το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας για τις πολλαπλές συγκρίσεις, όταν είναι ανομοιογενείς. Η μεταβλητή «είδος καλλιέργειας» δεν ακολουθεί την κανονική κατανομή και συνεπώς εφαρμόστηκαν μη παραμετρικά τεστ και συγκεκριμένα ο έλεγχος Kruskal-Wallis κι εν συνέχεια το Dunn's – Bonferroni για τις ανά ζεύγη συγκρίσεις. Το στατιστικό τέστ X^2 (chi-square) με τη βοήθεια πινάκων συνάφειας (crosstabs) χρησιμοποιήθηκε ώστε να προσδιοριστεί η αναλογία του πληθυσμού του δείγματος ποιοτικών δεδομένων (συχνότητα στελεχών παθογόνων) που ανήκει στην κάθε κατηγορία (είδος απολύμανσης, είδος καλλιέργειας) σύμφωνα με τα στελέχη που προσδιορίστηκαν με την τεχνική PFGE.

Αποτελέσματα και συζήτηση

Επίδραση των συνθηκών καλλιέργειας (μονής/μικτής) στο σχηματισμό βιοϋμενίου S. Typhimurium και S. aureus

Τα αποτελέσματα που αφορούν τον πληθυσμό του βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα από 3 στελέχη *S. Typhimurium* και 3 στελέχη *S. aureus* παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 33**. Ο σχηματισμός βιοϋμενίου της *S. Typhimurium* και του *S. aureus* επηρεάζονται από τις συνθήκες καλλιέργειας (μονή/μικτή καλλιέργεια). Συγκεκριμένα, η μικτή καλλιέργεια οδήγησε σε μείωση των προσκολλημένων κυττάρων κατά 10,7 φορές για τη *S. Typhimurium* και 8,9 φορές για τον *S. aureus* σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μονοκαλλιέργειες. Όσον αφορά τις μονοκαλλιέργειες, ο πληθυσμός της *S. Typhimurium* και του *S. aureus* ήταν 6,06 log και 5,57 log CFU/cm², αντίστοιχα. Τα

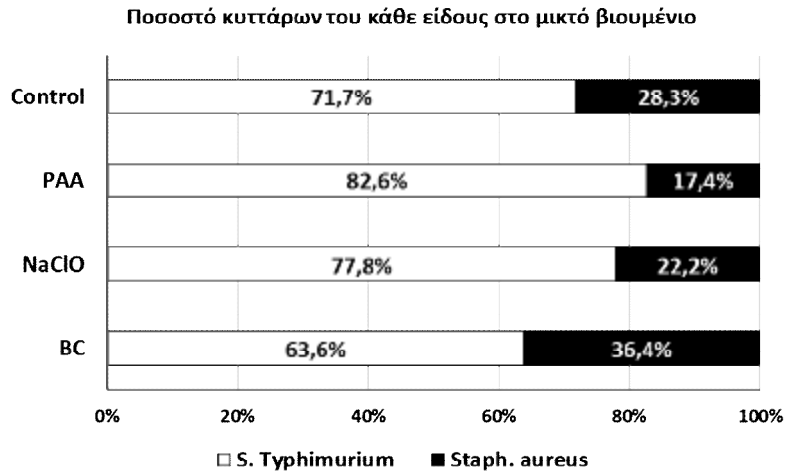
αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι συνθήκες μικτής καλλιέργειας οδήγησαν σε σημαντική μείωση του πληθυσμού των βιοϋμενικών κυττάρων της τάξης του 1,03 (*S. Typhimurium*) και 0,95 (*S. aureus*) log CFU/cm², σε σύγκριση με τις συνθήκες μονο-καλλιέργειας.



Διάγραμμα 33. Πληθυσμός βιοϋμενίου (log CFU/cm²) *S. Typhimurium* και *S. aureus*, υπό συνθήκες μονο/δι-καλλιέργειας σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα μετά από επώαση στους 20 °C για 144 h και επακόλουθη απολύμανση με χλωριούχο βενζαλκόνιο (BC), υποχλωριώδες νάτριο (NaClO) και υπεροξικό οξύ (PAA).

Με διαφορετικό πεζό γράμμα (a,b) επισημαίνονται στατιστικές σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα είδη απολύμανσης και αφορούν το ίδιο είδος καλλιέργειας. Με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα (A,B) επισημαίνονται οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα είδη καλλιέργειας και αφορούν το ίδιο είδος απολύμανσης.

Τα μικτά βιοϋμένια αποτελούνται σε υψηλότερο ποσοστό από βιοϋμενικά κύτταρα *S. Typhimurium* (71,7 %), σε σχέση με τον *S. aureus* (28,3 %). Σε μια πρόσφατη μελέτη, παραπλήσιος πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *S. enterica* (48,3 %) και *L. monocytogenes* (51,7 %) ανακτήθηκαν (Kostaki et al., 2012). Μια άλλη μελέτη που αφορούσε μικτό βιοϋμένιο 5 βακτηρίων (*S. enterica*, *L. monocytogenes*, *P. putida*, *S. simulans* και *L. fermentum*) έδειξε ότι αποτελούνταν κυρίως από κύτταρα *P. putida* (97,8 %), ενώ η *S. enterica* και *L. monocytogenes* αντιπροσώπευαν μαζί μόνο το 2,2 % του πληθυσμού (Chorianopoulos et al., 2008).



Διάγραμμα 34. Ποσοστά των εναπομείναντων βιοϋμενικών κυττάρων της *S. Typhimurium* (άσπρο) και *S. aureus* (μαύρο) σε μικτά βιοϋμένια μετά την απολύμανση (6 min) με PAA (10 ppm), NaClO (10 ppm) και BC (50 ppm). Τα control αφορούν τα δείγματα που δεν απολυμάνθηκαν.

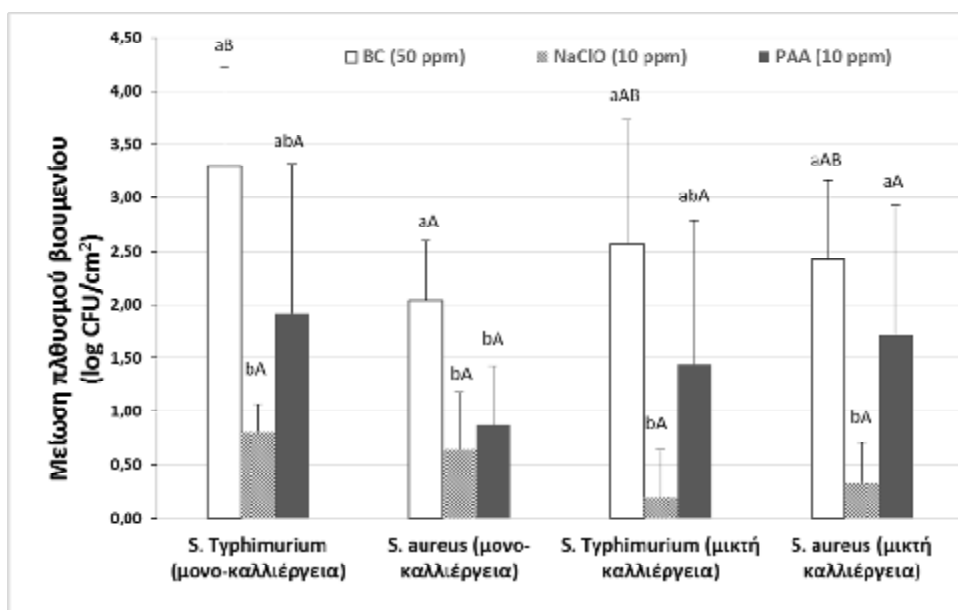
Όταν τα κουπόνια εμβαπτίστηκαν στο νερό για 6 min δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της μονής και μικτής καλλιέργειας του κάθε παθογόνου ξεχωριστά ($P < 0,05$). Ωστόσο, στα κουπόνια της *S. Typhimurium* παρέμειναν σημαντικά περισσότερα βιοϋμενικά κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα του *S. aureus* τόσο στις μονές όσο και στις μικτές καλλιέργειες.

Η εφαρμογή απολύμανσης επίσης οδήγησε σε διαφορές στον βιοϋμενικό πληθυσμό του *S. aureus* όσον αφορά τις συνθήκες καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, η παρουσία της *S. Typhimurium*, μείωσε στατιστικώς σημαντικά την αντίσταση των βιοϋμενικών κυττάρων του *S. aureus* στο χλωριούχο βενζαλκόνιο. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και στο υπεροξικό οξύ, όπου διαφορετική ανταπόκριση των βιοϋμενικών κυττάρων του *S. aureus* εντοπίστηκε σε σχέση με τον τύπο καλλιέργειας. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, και στο αρνητικό control φαίνεται ότι η παρουσία της *S. Typhimurium* στις μικτές καλλιέργειες μειώνει τον αριθμό των βιοϋμενικών κυττάρων του *S. aureus* σε σχέση με τη μονοκαλλιέργεια. Όμως όταν τα κουπόνια εμβαπτίστηκαν στο νερό δεν παρατηρήθηκε παρόμοια συμπεριφορά, γεγονός που μας οδηγεί να συμπεράνουμε ότι αυτή η διαφορά στην περίπτωση των απολυμαντικών οφείλεται στην πιθανή αύξηση της ευαισθησίας σε αυτά του *S. aureus*, παρουσία *S. Typhimurium*.

Επίδραση της απολύμανσης στον πληθυσμό βιοϋμενικών κυττάρων των *S. Typhimurium* και *S. aureus*

Το ποσοστό των προσκολλημένων κυττάρων της *S. Typhimurium* στα μικτά βιοϋμένια παρέμεινε σε παρόμοια επίπεδα με τα πρότυπα, μετά την απολύμανση με NaClO (77,8 %), με BC (63,6 %) και με PAA (82,6 %).

Σύμφωνα με το είδος της απολύμανσης, το χλωριούχο βενζαλκόνιο σε συγκέντρωση 50 ppm είναι το πιο αποτελεσματικό από όλα τα απολυμαντικά ($P < 0,05$) σε όλες τις περιπτώσεις καλλιέργειας των βιοϋμενικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, όσο αφορά τις μονοκαλλιέργειες οδήγησε σε μείωση κατά 3,3 log στα βιοϋμενικά κύτταρα της *S. Typhimurium* και κατά 2,04 log του *S. aureus*. Στις μικτές καλλιέργειες ο πληθυσμός του βιοϋμενίου μειώθηκε κατά 2,59 και 2,43 log για την *S. Typhimurium* και τον *S. aureus*, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 35. Μέση μείωση πληθυσμού ± τυπική απόκλιση βιοϋμενικών κυττάρων *S. Typhimurium* και *S. aureus* σε μονό- ή μικτή καλλιέργεια μετά την εφαρμογή απολύμανσης 6 min με χλωριούχο βενζαλκόνιο (BC), υποχλωριώδες νάτριο (SH), υπεροξικό οξύ (PAA).

Με διαφορετικό πεζό γράμμα (a,b) επισημαίνονται στατιστικές σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα είδη απολύμανσης και αφορούν το ίδιο είδος καλλιέργειας. Με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα (A,B) επισημαίνονται οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα είδη καλλιέργειας και αφορούν το ίδιο είδος απολύμανσης.

Πίνακας 13. Βιοϋμενικός πληθυσμός των *S. Typhimurium* και *S. aureus* (log CFU/ cm²) σε μονή/μικτή καλλιέργεια και μετά τη χρήση απολυμαντικών (χλωριούχο βενζαλκόνιο, υποχλωριώδες νάτριο, υπεροξικό οξύ)

Είδος απολύμανσης/	Είδος καλλιέργειας			
	<i>S. Typhimurium</i> (μονοκαλλιέργεια)	<i>S. aureus</i> (μονοκαλλιέργεια)	<i>S. Typhimurium</i> (μικτή καλλιέργεια)	<i>S. aureus</i> (μικτή καλλιέργεια)
Χλωριούχο βενζαλκόνιο	2.84±0.54 ^{a1AB2}	3.62±0.31 ^{ab}	2.52±1.03 ^{aA}	2.28±0.52 ^{aA}
Υποχλωριώδες νάτριο	5.33±0.43 ^{bcA}	5.01±0.26 ^{bA}	4.91±0.59 ^{cA}	4.37±0.26 ^{bbB}
Υπεροξικό οξύ	3.10±0.56 ^{baB}	4.78±0.07 ^{bA}	2.80±0.68 ^{baB}	2.31±1.22 ^{abB}
Πρότυπο	6.14±0.51 ^{cA}	5.66±0.53 ^{cA}	5.11±0.30 ^{cB}	4.71±0.31 ^{bbB}

¹ Με διαφορετικό πεζό γράμμα (a,b) επισημαίνονται στατιστικές σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα είδη απολύμανσης και αφορούν το ίδιο είδος καλλιέργειας. ² Με διαφορετικό κεφαλαίο γράμμα (A,B) επισημαίνονται οι διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα είδη καλλιέργειας και αφορούν το ίδιο είδος απολύμανσης

Το υπεροξικό οξύ σε συγκέντρωση 10 ppm ήταν το δεύτερο πιο αποτελεσματικό στη μείωση του πληθυσμού του βιοϋμενίου. Η μείωση των βιοϋμενικών κυττάρων που παρατηρήθηκε ήταν της τάξης των 1,92 log και 1,44 log (μονή και μικτή καλλιέργεια *S. Typhimurium*). Όσον αφορά την μείωση του πληθυσμού του βιοϋμενίου του *S. aureus* ήταν 0,87 και 1,71 log, για την μονή και μικτή καλλιέργεια αντίστοιχα. Η παρουσία της *S. Typhimurium* μείωσε την ανθεκτικότητα του *S. aureus*, τόσο στο χλωριούχο βενζαλκόνιο όσο και στο υπεροξικό οξύ.

Το υποχλωριώδες νάτριο σε συγκέντρωση 10 ppm δεν ήταν αποτελεσματικό για την απολύμανση των κουπονιών, καθώς δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά με τα κουπόνια που εμβαπτίστηκαν σε νερό ($P > 0,05$). Η αντίσταση του βιοϋμενίου στην χλωρίνη δεν είναι πλήρως γνωστή, ωστόσο, εν μέρει οφείλεται στη παρεμπόδιση της διείσδυσης του απολυμαντικού στο εσωτερικό του βιοϋμενίου (Chen & Stewart, 1996, De Beer et al., 1994, Xu et al., 1996). Η χαμηλή και ανεπαρκής διείσδυση του απολυμαντικού στο βιοϋμένιο οφείλεται αφενός μεν στην περιορισμένη διάχυση στην εξωκυτταρική ουσία, αφετέρου δε στην εξουδετέρωση της δραστικής ουσίας στις περιφερειακές περιοχές του βιοϋμενίου. Μελέτες έχουν δείξει ότι το ενεργό χλώριο αλληλεπιδρά με την οργανική ουσία στα επιφανειακά στρώματα του βιοϋμενίου ταχύτερα από ότι διαχέεται στο εσωτερικό του βιοϋμενίου (Chen & Stewart, 1996, Xu et al., 1996). Οι Solano et al. (2002) απέδειξαν ότι η εξωκυτταρική ουσία του βιοϋμενίου προστάτευσε τα κύτταρα της *S. Enteritidis* από την χλωρίνη.

Η εμβάπτιση του κουπονιού σε νερό δεν φάνηκε να επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά τον πληθυσμό του βιοϋμενίου σε σύγκριση με το αρνητικό πρότυπο (κουπόνι χωρίς καμία εφαρμογή) στη μικτή καλλιέργεια, ωστόσο στη μονοκαλλιέργεια υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Η εξήγηση γι' αυτό το φαινόμενο μπορεί να αιτιολογηθεί λόγω της πυκνότητας του βιοϋμενίου. Πιθανώς τα μικτά βιοϋμένια να έχουν πιο συνεκτική δομή και λιγότερα ελαφρώς προσκολλημένα κύτταρα.

Ομοίως με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, οι τεταρτοταγείς βάσεις αμμωνίου ήταν πιο αποτελεσματικές στην απολύμανση βιοϋμενίου της *L. monocytogenes* σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα σε σχέση με το υπεροξικό οξύ και τη χλωρίνη (Belessi et al., 2011). Οι Holah et al. (1990) και Meyer (2001) κατέταξαν την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών έναντι στα βιοϋμενικά κύτταρα με αύξουσα σειρά από τεταρτοταγείς βάσεις αμμωνίου, σε αμφοτερικίνη, χλωρίνη, διγουανίνες και υπεροξικά οξέα. Οι Fatemi & Frank (1999) ανέφεραν ομοίως ότι τα υπεροξικά ήταν πιο αποτελεσματικά σε σχέση με τη χλωρίνη στην απολύμανση μικτών βιοϋμενίων *Pseudomonas* sp. και *L. monocytogenes* σε ανοξειδωτο χάλυβα.

Ωστόσο, οι Mosteller & Bishop (1993) ανέφεραν την ίδια αποτελεσματικότητα μεταξύ χλωρίνης και υπεροξικού οξέος της σε βιοϋμένια των *Ps. fluorescens*, *L. monocytogenes* και *Y. enterocolitica* σε επιφάνειες καουτσούκ και τεφλόν. Μια συγκριτική μελέτη των Rossoni & Gaylarde (2000) ανέφερε το υποχλωριώδες νάτριο ως πιο αποτελεσματικό έναντι του υπεροξικού οξέος έναντι των *E. coli*, *P. fluorescens* και *S. aureus* σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα. Οι Trachoo & Frank (2002) απέδειξαν ότι η χλωρίνη ήταν πιο αποτελεσματική από το υπεροξικό οξύ έναντι μικτών βιοϋμενίων του *Campylobacter jejuni* σε μικτά βιοϋμένια. Αντιθέτως, η *L. innocua* αποδείχθηκε πιο ανθεκτική στο υποχλωριώδες νάτριο σε σχέση με το υπεροξικό οξύ σε μικτά βιοϋμένια σε σχέση με τη μονή καλλιέργεια σε ανοξειδωτο χάλυβα, τεφλόν και καουτσούκ (Bourion & Cerf 1996).

Πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί για τη σύγκριση της αντιβακτηριακής δράσης κοινών απολυμαντικών κάτω από διαφορετικές συνθήκες εφαρμογής (Andrade et al., 1998, Bagge-Ravn et al., 2003, Rossoni & Gaylarde, 2000). Η επίδραση του υπεροξικού οξέος και υποχλωριώδους νατρίου στη γενική υγιεινή και στη δράση ενάντια στη *L. monocytogenes* εφαρμόστηκε σε εργοστάσιο επεξεργασίας καπνιστού σολωμού (Bagge-

Ravn et al., 2003). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απολύμανση με εκνέφωση υπεροξικού οξέος ήταν πιο αποτελεσματική από τον αφρό υποχλωριώδους νατρίου, 29 έως 78 % και 14 έως 42 % των δειγμάτων είχαν λιγότερο από 10 CFU αν δείγμα επιφάνειας. Όμως, οι Rossoni και Gaylarde (2000) είχαν αντίθετα αποτελέσματα όταν μελέτησαν την επίδραση υποχλωριώδους νατρίου και υπεροξικού οξέος σε *E. coli*, *P. fluorescens* και *S. aureus* που απομονώθηκε από σφάγια κοτόπουλου που προσκολλήθηκαν σε ανοξείδωτο χάλυβα. Τα τεστ διεξήχθησαν με συγκέντρωση 250 ή 1000 mg/l για το υπεροξικό οξύ και 100 ή 200 mg/l για το υποχλωριώδες νάτριο για 10 min. Σε όλες τις περιπτώσεις το υποχλωριώδες νάτριο ήταν πιο αποτελεσματικό από το υπεροξικό οξύ σε θανάτωση ή στην απομάκρυνση των προσκολλημένων κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υπεροξικό οξύ είχε καλή δράση έναντι στην *P. fluorescens*, ενώ ήταν λιγότερο αποτελεσματικό έναντι του *S. aureus*. Στη συγκέντρωση των 250 mg/l υπεροξικού οξέος, η μείωση των ζωντανών προσκολλημένων κυττάρων ήταν πάνω από 90 % για την *P. fluorescens* και μόνο ελαφρώς πάνω από 50 % για τον *S. aureus*.

Ο Πίνακας 12 παρουσιάζει μεγάλο αριθμό μελετών όπου διερευνήθηκε η αυξημένη αντίσταση των μικτών βιοϋμενίων στα απολυμαντικά. Ένα παράδειγμα είναι η *E. coli* που φάνηκε να προστατεύει την *S. Typhimurium* σε μικτά βιοϋμένια από τη χλωρίνη (Wang et al., 2013). Άλλα παραδείγματα, η παρουσία της *Veillonella parvula* σε ένα βιοϋμένιο στόματος αύξησε κατά 50 % το επίπεδο επιβίωσης του *Str. mutans* απέναντι σε 5 αντιμικροβιακούς παράγοντες (Kara et al., 2006, Luppens et al., 2008). Σε άλλες περιπτώσεις μικτών βιοϋμενίων ο *Lactobacillus plantarum* προστάτευσε τη *L. monocytogenes* από τη δράση του χλωριούχου βενζαλκόνιου και του υπεροξικού οξέος (van der Veen & Abee, 2011), ενώ βιοϋμένιο που σχηματίστηκε από 9 περιβαλλοντικά στελέχη προστάτευσε διάφορα παθογόνα (*E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa*) έναντι της χλωρίνης (Schwering et al., 2013).

Σε μια άλλη μελέτη, στέλεχος *Bacillus subtilis* που απομονώθηκε από ενδοσκόπιο, και το οποίο ήταν εξαιρετικά ανθεκτικό σε υψηλές συγκεντρώσεις οξειδωτικών απορρυπαντικών λόγω καθημερινής χρήσης, ήταν ικανό να προστατεύει τον *S. aureus* από τη δράση του υπεροξικού οξέος σε μικτό βιοϋμένιο (Bridier et al., 2012). Ομοίως, η φυσιολογική χλωρίδα μαρουλιού αυξάνει την αντίσταση της *S. Typhimurium* σε ακτινοβολήση με χρήση UV (Jahid et al., 2015).

Αυτά τα παραδείγματα δεν θα πρέπει να μας οδηγήσουν να βγάλουμε το συμπέρασμα ότι τα μικτά βιοϋμένια παρέχουν σε όλες τις περιπτώσεις προστασία στα εμπλεκόμενα είδη μικροοργανισμών. Έτσι, η *L. monocytogenes* μπορεί να προστατευθεί από τη βιοκτόνα δράση σε μικτό βιοϋμένιο με τον *Lb. plantarum* (van der Veen & Abee, 2011), αλλά όχι με τη *S. enterica* ή τη *P. putida* (Chorianopoulos et al., 2008, Kostaki et al., 2012). Ομοίως, βιοϋμένια των *S. aureus*, *P. aeruginosa* και *C. albicans* φαίνονται να είναι πιο ευαίσθητα στα αντιμικροβιακά από τις αντίστοιχες μονοκαλλιέργειες (Kart et al., 2014). Ο *Enterococcus faecalis* ήταν πιο ευαίσθητος σε υποχλωριώδες νάτριο όταν καλλιεργήθηκε με 2 βακτήρια του στόματος (Yap et al., 2014).

Κατανομή των στελεχών της *S. Typhimurium* και *S. aureus* ανά συνθήκη καλλιέργειας και απολύμανσης

Επιπρόσθετα, με την τεχνική PFGE φάνηκε ότι τα διαφορετικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη είχαν διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά την ικανότητα δημιουργίας βιοϋμενίου και την αντίσταση στα απολυμαντικά (**Διάγραμμα 36**). Είναι προφανές ότι αν και το αρχικό ενοφθάλμισμα για κάθε στέλεχος και των δυο παθογόνων ήταν ίδιο (10^5 CFU/ml), το ώριμο βιοϋμένιο δεν αποτελούνταν από τον ίδιο αριθμό κυττάρων προσκολλημένων στα κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα. Είναι αξιοσημείωτο ότι το πολύ-ανθεκτικό στα αντιβιοτικά στέλεχος της *S. Typhimurium* (FMCC-137) και ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* (FMCC-410) συνιστούσαν το υψηλότερο ποσοστό των προσκολλημένων κυττάρων και στους δυο τύπους καλλιέργειας, όταν δεν εφαρμόστηκε καμία απολύμανση. Το ίδιο στέλεχος της *S. Typhimurium* επικράτησε επίσης στα μονά/μικτά βιοϋμένια, μετά την απολύμανση με χλωριούχο βενζαλκόνιο και υποχλωριώδες νάτριο. Ωστόσο, το στέλεχος FMCC-137 όταν συνκαλλιεργήθηκε με τα στελέχη του *S. aureus* ήταν λιγότερο ανθεκτικό στο υπεροξικό οξύ και ανακτήθηκε σε χαμηλότερο ποσοστό. Αναφορικά με τον *S. aureus*, το στέλεχος FMCC-134 επικράτησε υπό συνθήκες μονοκαλλιέργειας ενώ στο στέλεχος FMCC-410 ήταν το κυρίαρχο στις μικτές καλλιέργειες και η τάση αυτή ήταν διακριτή σε όλα τα απολυμαντικά.

Συνοψίζοντας, η αναλογία των στελεχών της *S. Typhimurium* δεν φαίνεται να επηρεάζεται από το είδος της καλλιέργειας (μονή ή μικτή), ενώ σχετικά με τον *S. aureus*

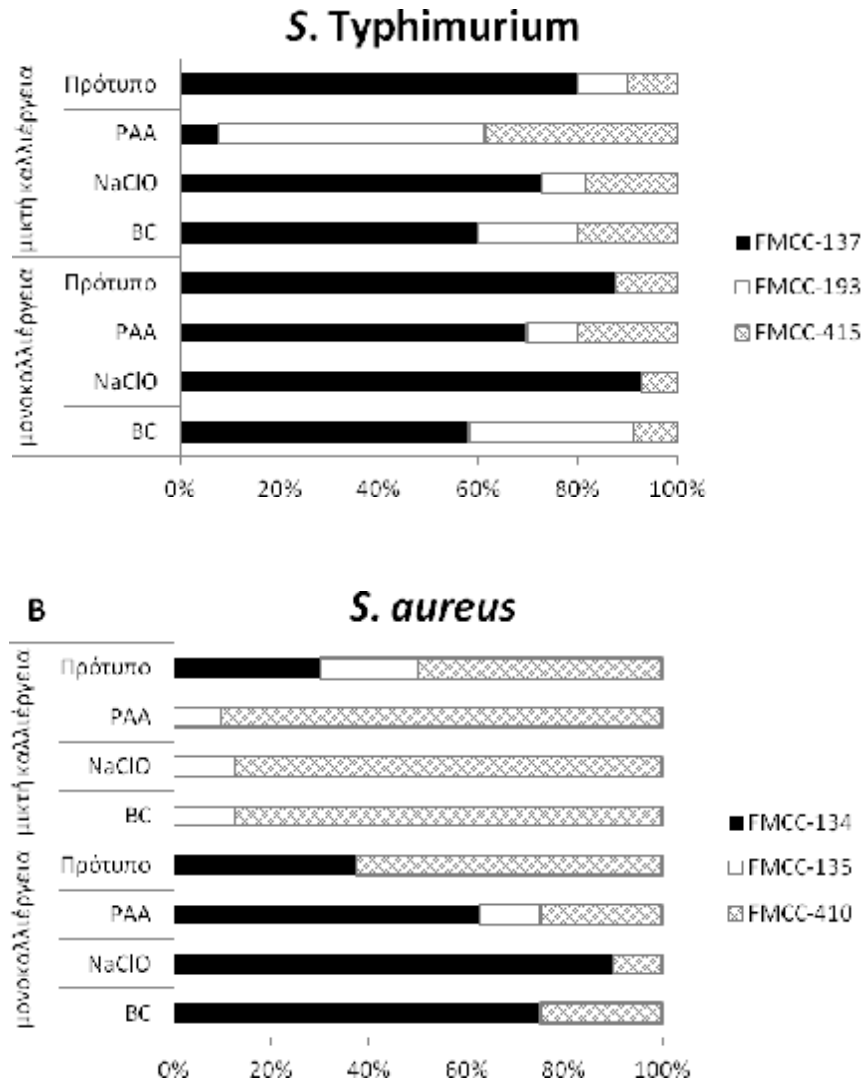
τα ποσοστά των 3 στελεχών δεν φαίνεται να διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε όλες τις περιπτώσεις απολύμανσης ή μη. Αντιθέτως, η αναλογία των στελεχών του *S. aureus* διαφέρει ανάλογα με το είδος της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, στη μονή καλλιέργεια υπερτερεί το στέλεχος FMCC-134 έναντι των στελεχών FMCC-135 και FMCC-410 ενώ στη μικτή καλλιέργεια παρατηρείται το αντίστροφο φαινόμενο. Αντίστοιχα, η αναλογία των στελεχών της *S. Typhimurium* διαφέρει ανάλογα με το είδος της απολύμανσης, και συγκεκριμένα το ποσοστό του στελέχους FMCC-137, όταν εφαρμόστηκε η απολύμανση με υπεροξικό οξύ είναι στατιστικώς σημαντικά μικρότερο από τα στελέχη FMCC-193 και FMCC-415.

Η ανάλυση της PFGE έδειξε ότι τα 3 στελέχη της *L. monocytogenes* δεν συμμετείχαν στο ίδιο επίπεδο στον τελικό πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων και εξαρτώνται από τις συνθήκες καλλιέργειας (μονοκαλλιέργεια/μικτή με *S. enterica*) και την ευαισθησία στα απολυμαντικά (PAA, NaClO, BC) (Kostaki et al., 2012). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν όταν χρησιμοποιήθηκαν βιοϋμένια από 3 στελέχη *L. monocytogenes* και 3 στελέχη *Pseudomonas putida* (Giaouris et al., 2013). Κάθε στέλεχος συνείσφερε σε διαφορετικό ποσοστό μετά την απολύμανση με χλωριούχο βενζαλκόνιο και την ημέρα της απολύμανσης (1^η, 10^η μέρα), ενώ ένα στέλεχος της *L. monocytogenes*, που απομονώθηκε από Ιταλικό εργοστάσιο επεξεργασίας τροφίμων, ήταν επικρατές σε όλες τις περιπτώσεις (Giaouris et al., 2013). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι ο ορότυπος 1/2a της *L. monocytogenes* επικράτησε των άλλων οροτύπων σε μικτά βιοϋμένια (Pan et al., 2009).

Συμπεράσματα

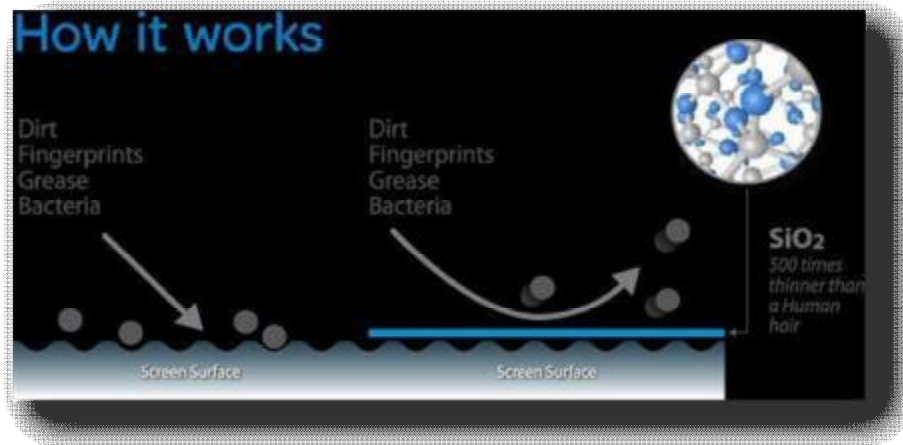
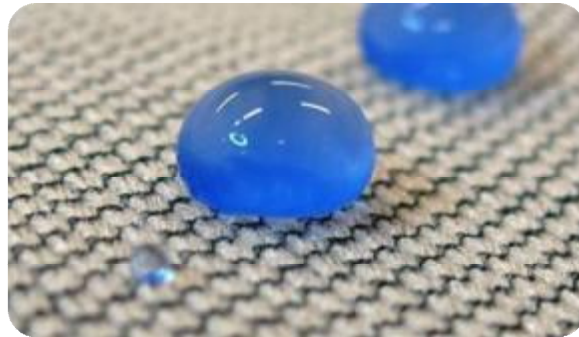
Τα δεδομένα που λήφθηκαν από αυτή τη μελέτη έδειξαν ότι οι συνθήκες καλλιέργειας σε συνδυασμό με την εφαρμογή απολύμανσης μπορεί να μεταβάλλουν τη συμπεριφορά που υιοθετείται από τα εκάστοτε στελέχη. Συνεπώς, μπορούν να βοηθήσουν στη διεύρυνση της γνώσης σχετικά με την φυσιολογία των βιοϋμενικών κοινοτήτων υπό συνθήκες μικτής καλλιέργειας τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων, καθώς ο προσδιορισμός των εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ειδών, που οδηγούν σε ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στα απολυμαντικά είναι σημαντικός ώστε να εγκαθιδρυθούν νέες στρατηγικές έναντι στα παθογόνα. Συμπερασματικά, τα μικτά βιοϋμένια είναι συστήματα με ποικίλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών ειδών, γεγονός που

ενισχύει την άποψη ότι τα βακτήρια αναπτύσσουν διαφορετικές στρατηγικές ώστε να προσαρμοστούν στις περιβαλλοντικές συνθήκες και να συνυπάρξουν σε κοινότητες βιοϋμενίων.



Διάγραμμα 36. Ποσοστιαία αναλογία ανά στέλεχος *S. Typhimurium* (A) ή *S. aureus* (B) σε μονό ή μκτό βιοϋμένιο, μετά την εφαρμογή για 6 min τριών απολυμαντικών (BC, PAA και NaClO). Το H₂O αναφέρεται σε κουπόνια που εμβαπτίστηκαν σε αποστειρωμένο νερό για 6 min ενώ το πρότυπο αφορά τα κουπόνια που δεν υπέστησαν καμία απολύμανση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7



Επίδραση υπερ-υδρόφοβης επίστρωσης σε μεταλλικές και γυάλινες
αβιοτικές επιφάνειες στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων *S.*
Typhimurium, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* και *S.*
aureus

Εισαγωγή

Τα βιοϋμένια είναι ο κύριος τύπος ανάπτυξης των βακτηρίων σε σχέση με την πλαγκτονική μορφή (Giaouris et al., 2013, Lindsay & von Holy, 2006). Ο σχηματισμός βιοϋμενίου συνίσταται από τουλάχιστον δύο στάδια: την προσκόλληση των κυττάρων σε αδρανείς επιφάνειες και τη συσσώρευση των κυττάρων προς σχηματισμό πολύστιχων κυτταρικών συμπλεγμάτων που περιβάλλονται από πολυσακχαρίτες που παράγονται από τα ίδια τα βακτήρια (Götz, 2002). Η διαδικασία της προσκόλλησης εξαρτάται από το είδος του βακτηρίου, το θρεπτικό υπόστρωμα και την επιφάνεια. Ο έλεγχος των βιοϋμενίων είναι θεμελιώδους σημασίας για την βιομηχανία τροφίμων και τον ιατρικό τομέα, καθώς συχνά αναπτύσσουν φαινότυπους με αντίσταση σε αντιμικροβιακούς και απολυμαντικούς παράγοντες (Araújo et al., 2011, Bridier et al., 2011, Finlay & Falkow, 1997, Hoyle & Costerton, 1991). Οι ιδιότητες της επιφάνειας είναι αυτές μόνο που πρακτικά μπορούν να τροποποιηθούν, με απώτερο σκοπό την μείωση της προσκόλλησης και της διασποράς των βακτηρίων, που είναι ο κύριος στόχος της βιομηχανίας τροφίμων (Pereni et al., 2006)

Πολλές μελέτες έχουν περιγράψει την ικανότητα τροφιμογενών παθογόνων να προσκολλώνται σε διάφορες επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων και να σχηματίζουν βιοϋμένια (Giaouris et al., 2012), συμπεριλαμβανομένων της *L. monocytogenes* (Belessi et al., 2011, Blackman & Frank, 1996, Chorianoopoulos et al., 2011, Di Bonaventura et al., 2008, Galvgo et al., 2012, Gamble & Muriana, 2007, Kushwava & Muriana, 2009, Midelet & Carpentier, 2002, Moretro & Langsrud, 2004, Pan et al., 2009, Poimenidou et al., 2009, Renier et al., 2011, Stophorth et al., 2002), *S. enterica* (Bhowmick et al., 2011, Chia et al., 2009, Chia et al., 2011, Giaouris et al., 2005, Giaouris & Nychas, 2006, Giaouris et al., 2012, Habimana et al., 2010, Kim & Wei, 2007, Marin et al., 2009, Schonewille et al., 2012, Solomon et al., 2005, Stepanovic et al., 2003, Stepanovic et al., 2004), *E. coli* O157:H7 (Ashton et al., 2006, Dourou et al., 2011, Farrell et al., 1998, Habimana et al., 2010, Marouani-Gardi et al., 2009, Skandamis et al., 2009, Stopforth et al., 2006, Yoon & Sofos, 2008), *S. aureus* (Bae et al., 2012, Nostro et al., 2012, Orgaz et al., 2011, Rieu et al., 2008, Rode et al., 2007) και *Y. enterocolitica* (Kim et al., 2008, Raczowska et al., 2011).

Λαμβάνοντας υπόψιν τις ιατρικές και τις οικονομικές συνέπειες του σχηματισμού βιοϋμενίων, η κατανόηση της διαδικασίας του αποικισμού θα μπορούσε να βοηθήσει στο σχεδιασμό και την τροποποίηση επιφανειών ικανών να προλαμβάνουν το σχηματισμό του βιοϋμενίου (Prigent-Combaret et al., 1999). Η τροποποίηση της επιφάνειας αναφέρεται στην αλλαγή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων ενός αδρανούς υποστρώματος (π.χ. τραχύτητα, υδροφοβικότητα κ.ά.), η οποία οδηγεί σε συγκεκριμένες βιοχημικές αλληλεπιδράσεις που προλαμβάνουν το στάδιο της προσκόλλησης και τον επακόλουθο σχηματισμό βιοϋμενίου (Kasimanickam et al., 2013).

Ακολουθώντας αυτή την προσέγγιση, τα νανοϋλικά έχουν προταθεί ως δυνητικά επεμβατική στρατηγική για τον έλεγχο του σχηματισμού βιοϋμενίου από αρκετές μελέτες, εξαιτίας των μοναδικών ιδιοτήτων τους. Η ιδέα ότι τα νανοδομημένα υλικά παρουσιάζουν μοναδικές ιδιότητες αποδίδεται στους Gleiter και Turnbull, για την εργασία που έκαναν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο στις αρχές της δεκαετίας του '80. Από τότε, το πεδίο της νανοτεχνολογίας έχει επεκταθεί χάρη στην συνειδητοποίηση των ενδεχόμενων τεχνολογικών πλεονεκτημάτων. Από το 1990, έχει γίνει σημαντική πρόοδος τόσο στην κατασκευή υλικών όσο και στην εξομοίωση στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, καθώς επίσης και στην ανάπτυξη εργαλείων ανάλυσης ατομικών, μοριακών και κρυσταλλογραφικών δομών. Με τον όρο νανοτεχνολογία (Bhattacharjee & Perez-Conde, 2003) αναφερόμαστε στον σχεδιασμό, στον χαρακτηρισμό, στην παραγωγή και στην εφαρμογή δομών, συσκευών και συστημάτων με ελεγχόμενο σχήμα και μέγεθος στην νανοκλίμακα. Ενώ, με τον όρο νανοεπιστήμη, αναφερόμαστε στην μελέτη φαινομένων και στον χειρισμό υλικών στην ατομική, στην μοριακή και στην μακρομοριακή κλίμακα, όπου οι ιδιότητες των υλικών διαφέρουν σημαντικά από αυτές σε μεγαλύτερη κλίμακα.

Τα νανοϋλικά έχουν αναπτυχθεί για ποικιλία εφαρμογών στα τρόφιμα (πρόσθετα τροφίμων, επιστρώσεις επιφανειών τροφίμων, συσκευασία κ.ά.) και σε ιατρικές συσκευές (καθετήρες, εμφυτεύματα κ.ά.). Εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους (1-100 nm) και της ικανότητάς τους να καλύπτουν μεγαλύτερη επιφάνεια σε σχέση με τον όγκο τους κατέχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες σε σχέση με τα υλικά που αποτελούνται από σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους (Bouwmeester et al., 2014, Oberdörster et al., 2005).

Οι οργανολειτουργικές σιλάνες θα μπορούσαν να είναι υποψήφιες για τη τροποποίηση επιφανειών, καθώς μπορούν να τροποποιήσουν τη διαβρεκτικότητα των

επιφανειών μέσω της αλληλεπίδρασης των εξωτερικών επιφανειών με το νερό, επιτυγχάνοντας ποικίλους βαθμούς υδροφοβικότητας ή υδροφιλικότητας (Mittal, 2009). Οι οργανοσιλάνες είναι μια ομάδα υβριδικών ενώσεων που αποτελούνται από μια δομή που σχηματίζεται από ένα ανόργανο κι ένα οργανικό μέρος και περιέχουν τουλάχιστον ένα δεσμό άνθρακα-πυριτίου (π.χ., Si-CH₃) (Kregiel and Niedzielska 2014). Το πυρίτιο είναι ένα μέταλλο με ατομικό αριθμό 14 και είναι το βασικό άτομο των οργανοσιλάνων. Το πυρίτιο είναι μοναδικό στοιχείο καθώς, εκτός του ότι σχηματίζει κυρίως ιονικούς δεσμούς με το οξυγόνο, σχηματίζει σταθερούς δεσμούς με τον άνθρακα κι έτσι δημιουργεί ανόργανες δομές με οργανική λειτουργικότητα (Thames & Panjani, 1996).

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει την αντιμικροβιακή ικανότητα νανοδομημένων επιστρώσεων που αποτελούνται από πυρίτιο και οργανοσιλάνες, ωστόσο τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Τα νανοσωματίδια πυριτίου έχουν βρεθεί να περιορίζουν την προσκόλληση και την ανάπτυξη σε επιφάνεια της *Candida albicans* (Cousins et al., 2007). Μια άλλη μελέτη βρήκε ότι συγκέντρωση διοξειδίου πυριτίου άνω των 1000 ppm απαιτήθηκε για να επιτευχθεί αντιβακτηριακή δράση έναντι των *Bacillus subtilis* και *E. coli* (Adams et al., 2006). Οι επιφάνειες πολυαιθυλενίου, μετά την ενεργοποίηση με τη χρήση πλάσματος και τροποποίηση με οργανοσιλάνες, επιδεικνύει ιδιότητες αντιπροσκόλλησης και αντιβιοϋμενικές έναντι της *Aeromonas hydrophila* (Kregiel & Niedzielska, 2014). Γυάλινες επιφάνειες τροποποιημένες με υδρόφοβες σιλάνες και νανοσωματίδια πυριτίου μείωσαν το μέσο αριθμό των προσκολλημένων κυττάρων των *E. coli*, *S. aureus* και *Deinococcus geothermalis* σε σύγκριση με τα νανοσωματίδια άμορφου πυριτίου (Song et al., 2011). Η μείωση της προσκόλλησης των *S. aureus* και *P. aeruginosa* σε υπερ-υδρόφοβες επιφάνειες που επιστρώθηκαν με φθοριούχα κολλοειδή πυριτίου επίσης έχει αποδειχθεί (Privett et al., 2011).

Αντιθέτως, νανοσωματίδια πυριτίου έναντι παθογόνων στελεχών της στοματικής κοιλότητας *Streptococcus mutants*, είχαν περιορισμένη αντιβακτηριδιακή επίδραση στην πλαγκτονική ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε βοθρία πολυστυρενίου (Besinis et al., 2014). Κατά τη διάρκεια εκτίμησης αποτελεσματικότητας δύο προϊόντων οργανοσιλάνων που εφαρμόστηκαν σε επιφάνειες δωματίων ασθενών σε χώρους υγειονομικής περίθαλψης δεν παρατηρήθηκε σημαντική υπολειμματική αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα (Boyce et al., 2014). Το νιτρικό οξύ (NO) εγκλεισμένο σε νανοσωματίδια πυριτίου βρέθηκε να

είναι αποτελεσματικό στον περιορισμό των *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* και *Candida albicans* (Hetrick et al., 2009). Ωστόσο, τα νανοσωματίδια πυριτίου χωρίς νιτρικό οξύ δεν μείωσαν το βακτηριακό πληθυσμό, υποδεικνύοντας ότι το νιτρικό οξύ ήταν υπεύθυνο για την βιοκτόνο δράση.

Σκοπός μελέτης

Οι οργανολειτουργικές σιλάνες αποτελούν δυνητικά υποψήφιες ουσίες για επιστρώσεις, καθώς αυξάνουν την υδροφοβικότητα των τροποποιημένων επιφανειών. Αυτή η μελέτη εκτίμησε την αποτελεσματικότητα τροποποιημένων επιφανειών ανοξείδωτου χάλυβα και γυαλιού με εμπορικά προϊόντα με βάση τις οργανοσιλάνες, με σκοπό τη μελέτη πιθανών ιδιοτήτων αντι-προσκόλλησης και αντι-βιοϋμενικών έναντι σε παθογόνα βακτήρια. Τα παθογόνα που μελετήθηκαν ήταν: *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* και *E. coli* O157:H7. Αρχικά, διερευνήθηκε η ικανότητα συνολικά 10 στελεχών διαφόρων παθογόνων (2 από κάθε είδος) να σχηματίζουν βιοϋμένια σε επιφάνειες πολυστυρενίου, μετρώντας απορρόφηση μετά από χρώση με κρυσταλλικό ιώδες (Crystal Violet, CRV). Εν συνεχεία, προσδιορίστηκε η προσκόλληση των βακτηρίων (3 h) και ο σχηματισμός βιοϋμενίου (24, 48 και 72 h) σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα και γυαλιού με την εφαρμογή ή όχι επίστρωσης οργανοσιλανών (2 προϊόντα για κάθε είδος επιφάνειας) ποσοτικά με τη μέθοδο του «στροβιλισμού με σφαιρίδια».

Υλικά και μέθοδοι

Βακτηριακά στελέχη

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 2 στελέχη από κάθε είδος και συγκεκριμένα: *S. Typhimurium* (FMCC-137, 193), *S. aureus* (FMCC-135, 410), *L. monocytogenes* (FMCC-125, 129), *Y. enterocolitica* (FMCC-89, 90) και *E. coli* O157:H7 (FMCC-15, 19).

Προϊόντα και εφαρμογή υπερ- υδρόφοβης επίστρωσης

Χρησιμοποιήθηκαν τρία εμπορικά σκευάσματα της εταιρείας Liquid Glass Nanotech (<https://www.liquidglassnanotech.com/>) τα οποία διαθέτουν άδεια από τον οργανισμό EINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances), τα οποία, σύμφωνα με το χημικό χαρακτηρισμό, είναι πολυμερή από σιλάνες σε νανοσωματίδια (1-100nm):

- a. **Advanced Liquid Glass Technology Glass & Ceramics coating (LGN-600-1)** είναι μια προστατευτική επίστρωση για γυάλινες και κεραμικές επιφάνειες. Παρέχει υδρόφοβες και ελαιό-φοβες ιδιότητες κι έτσι απομακρύνονται τα υπολείμματα με αποτέλεσμα να παρέχεται ευκολία καθαρισμού των επιφανειών (OSG1).
- b. **Universal antibacterial ‘hard surfaces’ coating (LGN-671-ANTI)** για μη απορροφήσιμες/σκληρές επιφάνειες όπως γυαλί, πλαστικό, κεραμικά, ανοξείδωτο χάλυβα, χρώμιο και αλουμίνιο που παρέχει επιπλέον αντιβακτηριακή προστασία (OSS1).
- c. **Advanced Liquid Glass Technology Metals & Plastic (LGN-660-1)** είναι ένα γαλάκτωμα που εφαρμόζεται σε μέταλλα και πλαστικά για μη απορροφήσιμες/σκληρές επιφάνειες. Η ειδική νανοδομή του με τα μικροσωματίδια το διευκολύνει να εισέλθει στη δομή της επιφάνειας και βοηθά στην κάλυψη των αμυχών (OSS2).

Η εφαρμογή της υπερυδρόφοβης επίστρωσης στις επιφάνειες έγινε ακολουθώντας τις οδηγίες χρήσης του εκάστοτε προϊόντος. Η προς επίστρωση επιφάνεια καθαρίστηκε εξολοκλήρου με ισοπροπυλική αλκοόλη IPA (Isopropyl alcohol) και αφέθηκε να στεγνώσει για μερικά λεπτά, πριν το επόμενο στάδιο. Έπειτα εφαρμόστηκε η επίστρωση ψεκάζοντας το Crystalusion™ Liquid Glass Protection (“Crystalusion™”) σε ένα ύφασμα μικροϊνών και διανέμοντας σε όλη την επιφάνεια, αποφεύγοντας τα κενά. Τέλος, μετά από 24 h, σε περίπτωση εμφάνισης ορατών λευκών κηλίδων στην επιφάνεια, αφαιρούνται τρίβοντας με ύφασμα με μικροΐνες, κάνοντας κυκλικές κινήσεις και οι επιφάνειες είναι έτοιμες προς χρήση.

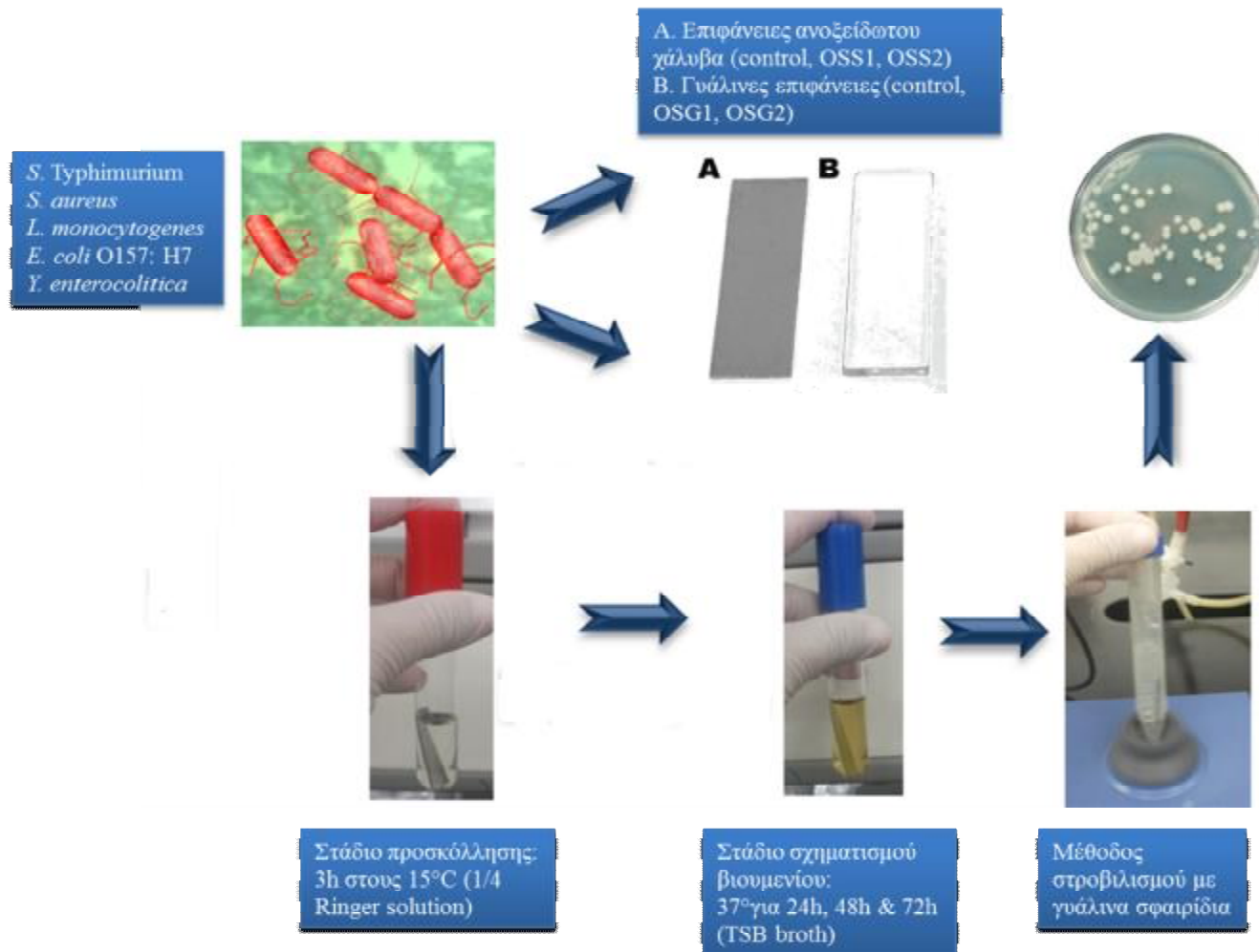
Επίσης χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικό προϊόν από την εταιρεία BFP hellas O.E. (<http://bfphellas.gr/>) το οποίο είναι καταχωρημένο στο Γενικό Χημείο του Κράτους, δεν περιέχει επικίνδυνες ουσίες και είναι φιλικό για τον άνθρωπο και το περιβάλλον.

d. **Nano-Skin [HOME]** (OSG2) αποτελείται από τρία διαλύματα (ένα γαλάκτωμα για την προετοιμασία της επιφάνειας και δύο σπρέι), τα οποία εφαρμόζονται διαδοχικά σε οποιαδήποτε γυάλινη ή κεραμική επιφάνεια, ώστε να δημιουργηθεί ένα φιλμ σε αυτήν που επιτρέπει για τα επόμενα πέντε χρόνια τον εύκολο καθαρισμό της. Το γαλάκτωμα (NANO-SKIN [1]) βασίζεται σε μια ειδική σύνθεση, που επαναφέρει το γυαλί στην αρχική του κατάσταση. Το NANO-SKIN [2] είναι ένα αλκοολούχο διάλυμα ενεργοποίησης, ενώ το NANO-SKIN [3] βασίζεται σε ολιγομερή πυριτίου, τα οποία ενσωματώνονται στην επιφάνεια προκαλώντας τον εύκολο καθαρισμό.

Η διαδικασία εφαρμογής διαφέρει από τα προηγούμενα προϊόντα και αποτελείται από 3 στάδια. Η εφαρμογή του διαλύματος NANO-SKIN [1] γίνεται με τριβή της επιφάνειας με κυκλικές κινήσεις, έως ότου το υγρό απλωθεί ομοιόμορφα στην επιφάνεια με τη χρήση μαλακού σφουγγαριού. Εν συνεχεία εφαρμόζεται το διάλυμα NANO-SKIN[2] με απευθείας ψεκασμό στο γυαλί και κατανομή σε όλη την επιφάνεια με πανί στεγνό. Τέλος, η επίστρωση με το NANOSKIN [3] έγινε με τη χρήση πανιού μικροϊνών, κάνοντας απαλές κυκλικές κινήσεις μετά από ψεκασμό του διαλύματος στην επιφάνεια. Η επικάλυψη αποκτά τη μέγιστη απόδοσή της μετά από 24 h.

Συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίου

Η επώαση έγινε στους 37 °C και η ποσοτικοποίηση του βιοϋμενίου σε βοθρία πολυστυρενίου έγινε στις 24 και 48 h. Στελέχη διαφορετικής προέλευσης (π.χ. απομονώσεις από κλινικά δείγματα, τρόφιμα ή περιβάλλον) επιλέχθηκαν σε μια προσπάθεια να επιτευχθεί ποικιλομορφία (variability). 10 στελέχη (*S. Typhimurium* 137, 193, *S. aureus* 135, 410, *Y. enterocolitica* 89, 90, *E. coli* O157:H7 15, 18 και *L. monocytogenes* 125, 129) με παρόμοια μέση οπτική απορρόφηση (OD₅₇₅) μελετήθηκαν ως προς το σχηματισμό βιοϋμενίου σε επιφάνειες γυαλιού και ανοξειδωτού χάλυβα με ή χωρίς επίστρωση. Οι επιφάνειες γυαλιού και ανοξειδωτού χάλυβα επώαστηκαν στους 37 °C για 72 h , σε στατικές συνθήκες για το σχηματισμό βιοϋμενίου και η δειγματοληψία έγινε στις 3 , 24 , 48 και 72 h.



Εικόνα 18. Πειραματικός σχεδιασμός 4^{ου} πειράματος

Ανάλυση δεδομένων

Το πείραμα του σχηματισμού βιοϋμενίου σε βοθρία πολυστερενίου διεξήχθη σε 8 επαναλήψεις, ενώ τα πειράματα του σχηματισμού βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα και γυάλινες διεξήχθησαν σε 3 επαναλήψεις. Για τον έλεγχο της κανονικής κατανομής εφαρμόστηκε το τεστ Shaphiro-Wilk. Η μεταβλητή «χρόνος» ακολουθεί την κανονική μεταβλητή. Η διασπορά των ομάδων ως προς τη μεταβλητή «χρόνος» είναι ανομοιογενής, σύμφωνα με τον έλεγχο του Levene και για να εξακριβωθεί μεταξύ ποιων ομάδων οφείλονται οι διαφορές, χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Post-hoc (κατά ζεύγη) σύμφωνα με τη μέθοδο Tamhane's T2, στον παραμετρικό έλεγχο one-way ANOVA. Οι μεταβλητές «είδος παθογόνου» και «είδος επίστρωσης» δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή, οπότε χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικοί έλεγχοι και ανά ζεύγη συγκρίσεις με τη μέθοδο Dunn's- Bonferroni.

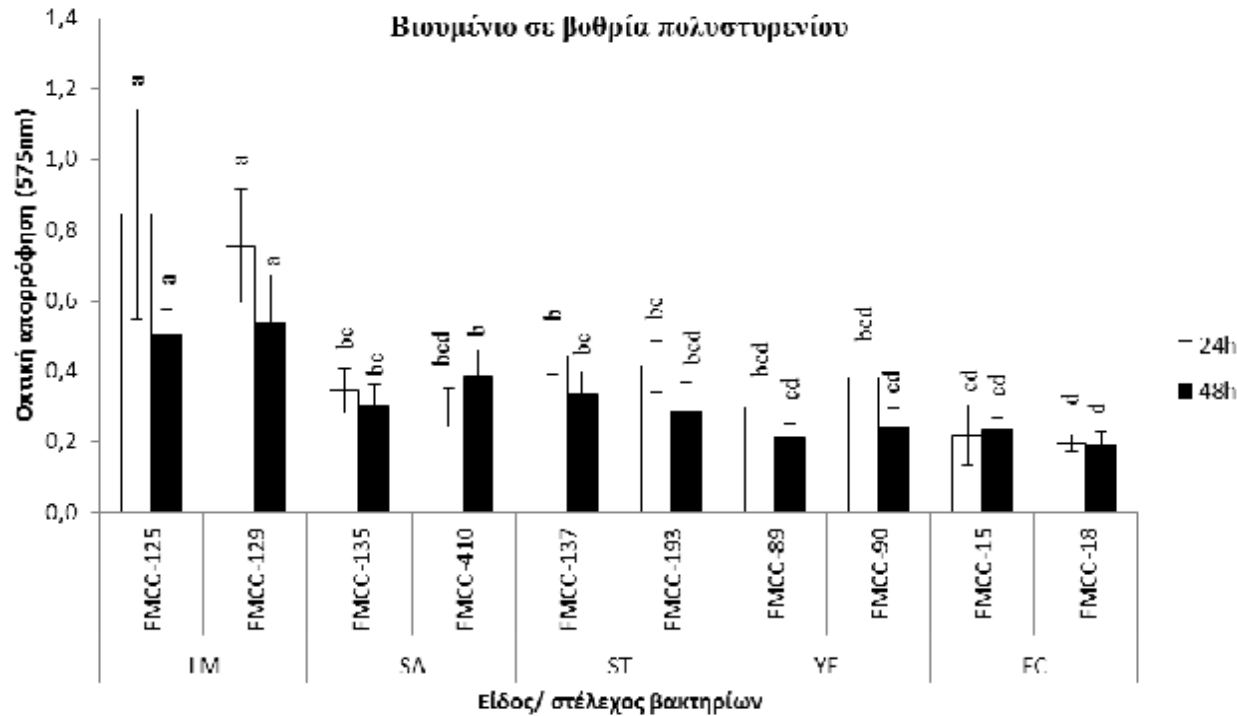
Αποτελέσματα και συζήτηση

Σχηματισμός βιοϋμενίου σε βοθρία πολυστερενίου

Η μέση οπτική απορρόφηση (OD_{575}) μετρήθηκε για όλα τα στελέχη στις 24 και 48 h (**Διάγραμμα 37**). Σχετικά με τις λαμβανόμενες τιμές οπτικής απορρόφησης και σύμφωνα με τη μελέτη του Stepanovic et al. (2004) ταξινομήθηκαν σε 4 κατηγορίες: μη σχηματισμού βιοϋμενίου ($OD \leq 0,2$), μικρής ($0,2 < OD \leq 0,4$), μέσης ($0,4 < OD \leq 0,8$) και υψηλής ($OD > 0,8$) ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου. Συγκεκριμένα, ένα στέλεχος (*L. monocytogenes* FMCC-125) ταξινομήθηκε ως ισχυρής ικανότητας σχηματισμού και ένα άλλο στέλεχος ως μη σχηματισμού (*E. coli* O157:H7 FMCC-18). Επιπροσθέτως, πέντε στελέχη ήταν μικρής ικανότητας σχηματισμού (*S. aureus* FMCC-135 και FMCC-410, *Y. enterocolitica* FMCC-89 και FMCC-90, *E. coli* O157:H7 FMCC-15). Τα υπόλοιπα τρία στελέχη ταξινομήθηκαν ως μέσης ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου (*S. Typhimurium* FMCC-137 και FMCC-193, *L. monocytogenes* FMCC-129).

Αρκετές μελέτες έχουν περιγράψει τη ικανότητα των παραπάνω στελεχών να προσκολλώνται σε διάφορες επιφάνειες και σχηματίζουν βιοϋμένια, με αυτή την ικανότητα να εξαρτάται άμεσα από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες (Giaouris et al., 2014). Ωστόσο στις περισσότερες από τις προηγούμενες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν

βιοϋμένια με ένα στέλεχος κι έτσι τα αποτελέσματα που προέκυψαν πιθανόν να μην είναι αντιπροσωπευτικά του είδους. Αναμφίβολα τα στελέχη ακόμη κι αν ανήκουν στο ίδιο είδος μπορεί να διαφέρουν στο φαινότυπο συμπεριλαμβανομένου και της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου και αυτή ποικιλομορφία θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη (Lianou and Koutsoumanis, 2013). Αυτός είναι ο λόγος ο οποίος στη παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν δυο διαφορετικά στελέχη για να σχηματίσουν βιοϋμένια. Η παρατηρούμενη φαινοτυπική παραλλακτικότητα που ποικίλει από χαμηλής ως υψηλής ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου ακόμη και σε επίπεδο στελέχους υπογραμμίζει τη σημασία των μελετών σε επίπεδο στελέχους σχετικά με επιβίωση και το σχηματισμό βιοϋμενίου.



Διάγραμμα 37. Σχηματισμός βιοϋμενίου διαφορετικών στελεχών *L. monocytogenes* (LM), *S. aureus* (SA), *S. Typhimurium* (ST), *Y. enterocolitica* (YE) και *E. coli* O157:H7 (EC) μετά από 24 h (άσπρες) και 48 h (μαύρες) επώασης στους 37 °C. Τα βιοϋμενικά κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν έμεσα με χρώση crystal violet και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 575nm. Οι μπάρες αντιστοιχούν σε μέσους όρους ± τυπική απόκλιση. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο σχηματισμό βιοϋμενίου μεταξύ των στελεχών για τον ίδιο χρόνο επώασης (24 ή 48 h).

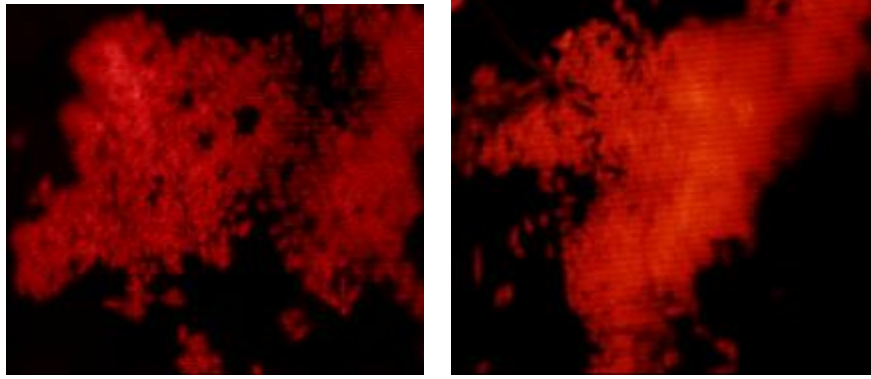
Σχηματισμός βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα και γυαλιού

Ο πληθυσμός του βιοϋμενίου εξαρτάται από το χρόνο επώασης, το είδος του βακτηρίου και το υλικό της επιφάνειας. Υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ γυαλιού και ανοξειδωτου χάλυβα τόσο στο στάδιο της προσκόλλησης (3 h), όσο και στο σχηματισμό του βιοϋμενίου (24, 48 h). Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων και του αντίστοιχου βιοϋμενικού πληθυσμού ήταν χαμηλότερος στο γυαλί.

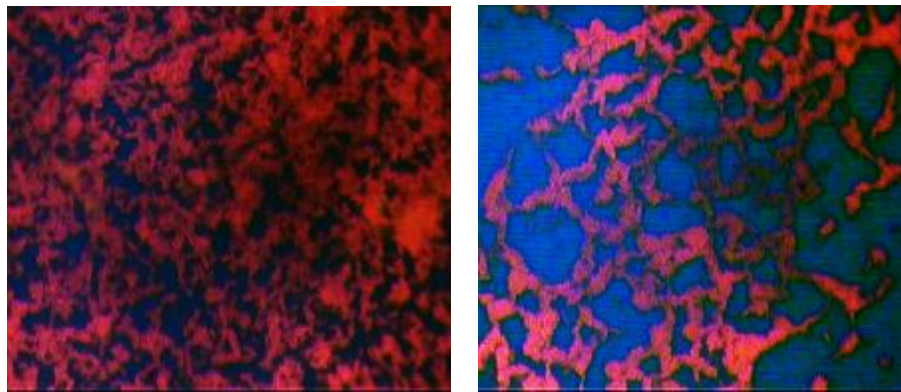
Η *S. Typhimurium* προσκολλήθηκε στις μη- επιστρωμένες γυάλινες επιφάνειες (3 h) σε υψηλότερο πληθυσμό (περίπου $4,32 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$) σε σχέση με τα *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* ($1,6-2,7 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$). Ο βιοϋμενικός πληθυσμός της *L. monocytogenes* και της *E. coli* στις 24 h ήταν ο υψηλότερος και χαμηλότερος, αντίστοιχα ($P < 0,05$). Οι *S. Typhimurium*, *S. aureus* και *Y. enterocolitica* είχαν παρόμοια επίπεδα βιοϋμενίου στις 24 h. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα δεδομένα που λήφθηκαν από τη δοκιμή των βοθρίων πολυστυρενίου. Μετα τις 48 h, τα βιοϋμενικά κύτταρα της *Y. enterocolitica* ήταν σημαντικώς μειωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα των *S. Typhimurium* και *L. monocytogenes*. Η *S. Typhimurium* και η *E. coli* διατήρησαν υψηλότερα επίπεδα προσκολλημένων κυττάρων σε σχέση με τη *Y. enterocolitica* στις 72 h.

Σχετικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνου και χρόνου επώασης, η *S. Typhimurium* και ο *S. aureus* είχαν παρόμοια τάση, καθώς ο βιοϋμενικός πληθυσμός τους έφτασε στο μέγιστο στις 24 h και σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στις 72 h. Η *E. coli* παρουσίασε διαφορετική συμπεριφορά, καθώς το επίπεδο των προσκολλημένων κυττάρων ακόμη και στις 72 h παρέμεινε σταθερό σε σχέση με το αντίστοιχο που καταγράφηκε στις 24 h. Ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων της *L. monocytogenes* στις 72 h ήταν παρόμοιος με τον αντίστοιχο στις 48 h, ενώ περαιτέρω μείωση παρατηρήθηκε για την *Y. Enterocolitica*.

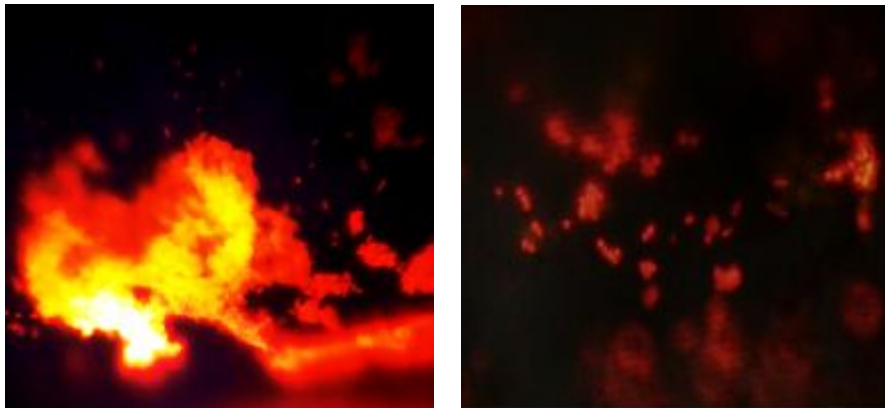
Ο *S. aureus* προσκολλήθηκε σε σημαντικώς χαμηλότερο επίπεδο στις γυάλινες επιφάνειες σε σχέση με τον ανοξειδωτο χάλυβα 3 h. Αντιθέτως, τα υπόλοιπα είδη παθογόνων είχαν παρόμοιο αριθμό προσκολλημένων κυττάρων στις δυο επιφάνειες. Ωστόσο, ο σχηματισμός βιοϋμενίου στις 24 h, ήταν στατιστικώς χαμηλότερος στις γυάλινες επιφάνειες για τους *S. Typhimurium*, *Y. enterocolitica* και *E. coli*.



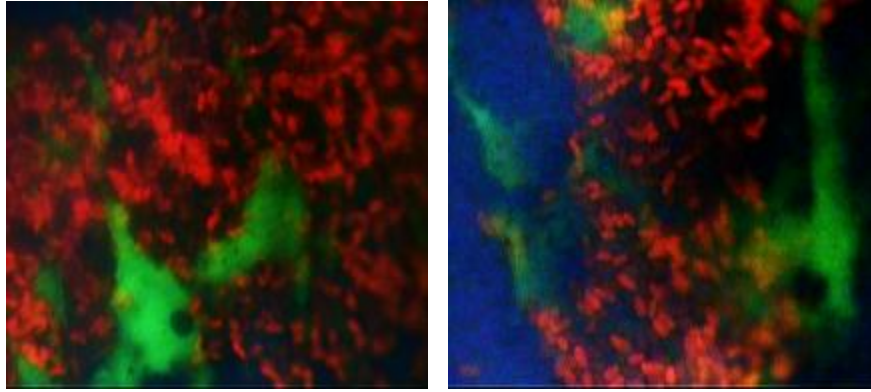
Εικόνα 19. Βιοϋμένιο της *S. Typhimurium* σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα ύστερα από επώαση στους 37 °C για 72 h μετά από χρώση με ακριδίνη



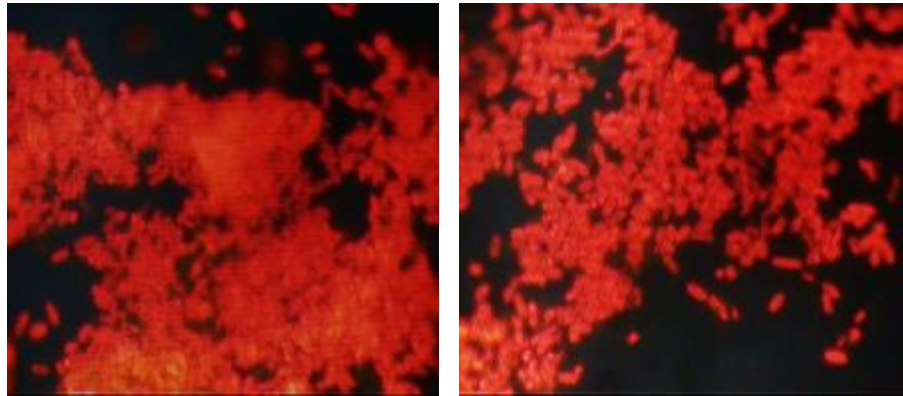
Εικόνα 20. Βιοϋμένιο της *L. monocytogenes* σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα ύστερα από επώαση στους 37 °C για 72 h μετά από χρώση με ακριδίνη



Εικόνα 21. Βιοϋμένιο του *S. aureus* σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα ύστερα από επώαση στους 37 °C για 72 h μετά από χρώση με ακριδίνη



Εικόνα 22. Βιοϋμένιο της *Y. enterocolitica* σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα ύστερα από επώαση στους 37 °C για 72 h μετά από χρώση με ακριδίνη



Εικόνα 23. Βιοϋμένιο της *E. coli* O157:H7 σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα ύστερα από επώαση στους 37 °C για 72 h μετά από χρώση με ακριδίνη

Επίδραση των επιστρώσεων οργανοσιλανών στο σχηματισμό βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα και γυαλιού

Ο αριθμός των κυττάρων που προσκολλήθηκε στις γυάλινες επιφάνειες φάνηκε να επηρεάζεται από το είδος των βακτηρίων και την εφαρμογή ή μη των επιστρώσεων των προϊόντων οργανοσιλανών (**Διάγραμμα 38**). Διαφορές ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν όσον αφορά τον πληθυσμό του βιοϋμενίου που καταγράφηκε στις 24, 48 και 72 h. Μόνο στο στάδιο της προσκόλλησης (3 h), το προϊόν NANO-SKIN φάνηκε να μειώνει τη συσσώρευση των κυττάρων των *S. Typhimurium* και *E. coli* στις επιφάνειες κατά περίπου $1,4 \log \text{ CFU/cm}^2$, σε σύγκριση με την μη τροποποιημένη επιφάνεια. Αντιθέτως, το προϊόν

Liquid Glass αύξησε την προσκόλληση του *S. aureus* στις γυάλινες επιφάνειες κατά 1,8 log CFU/cm² σε σύγκριση με τα κουπόνια στα οποία δεν εφαρμόστηκε επίστρωση.

Τα αποτελέσματα επίσης έδειξαν σημαντικές διαφορές στα κουπόνια του ανοξειδώτου χάλυβα που επιστρώθηκαν με οργανοσιλάνες σε σχέση με τις πρότυπες επιφάνειες (**Διάγραμμα 39**). Η επίδραση αυτή είχε άμεση εξάρτηση από το είδος των παθογόνων και το χρόνο επώασης. Οι επιφάνειες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε το προϊόν “Liquid Glass Polish” περιόρισε το σχηματισμό βιοϋμενίου συγκεκριμένων ειδών παθογόνων στις 24 h, ενώ και τα δύο προϊόντα ήταν αποτελεσματικά στις 48 h. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ωστόσο στο επίπεδο των προσκολλημένων κυττάρων στις 3 και στις 72 h. Τα δυο προϊόντα μείωσαν τον πληθυσμό της *S. Typhimurium* κατά περίπου 0,5 log CFU/cm², στις 24 h ($P < 0,05$). Μειωμένος αριθμός κυττάρων του *S. aureus* κατά 0,8-1,2 log CFU/cm² ανακτήθηκε στις 48 h. Το προϊόν “Liquid Glass Polish” ομοίως οδήγησε σε μείωση του σχηματισμού βιοϋμενίου της *Y. enterocolitica* στις 24 h κατά 1,8 log CFU/cm².

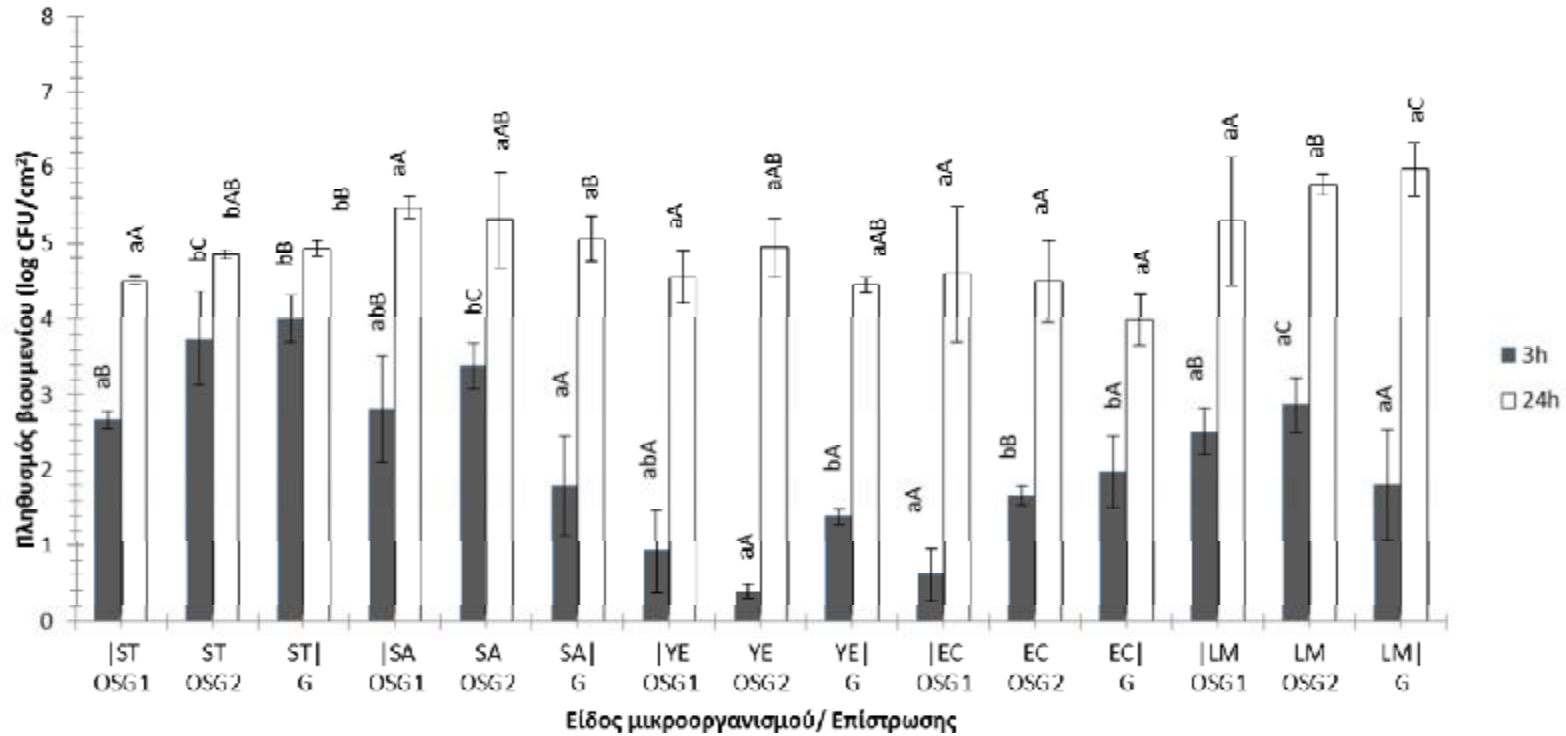
Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της αδρανούς επιφάνειας και του βακτηριακού κυττάρου έχουν επίδραση στην προσκόλληση και στο σχηματισμό βιοϋμενίου, αν και ακριβής συσχέτιση είναι δύσκολη, καθώς το σύστημα αλληλεπιδράσεων είναι σύνθετο και πολύπλοκο. Η υδροφοβικότητα των επιφανειών έχει αναφερθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας που φαίνεται να μειώνει την προσκόλληση των βακτηρίων στις επιφάνειες (Bonsaglia et al., 2014, Dickson & Daniels, 1991, van Loosdrecht et al., 1987) και παράλληλα αυξάνει την αποκόλληση των ήδη προσκολλημένων κυττάρων (Pereni et al., 2006). Ο ανοξειδωτος χάλυβας θεωρείται υδρόφοβο υλικό (Lafuma & Quéré, 2003), ενώ το γυαλί υδρόφιλο (Robert et al., 2001). Η τροποποίηση των επιφανειών με οργανοσιλάνες αυξάνει την υδροφοβικότητα των πρότυπων επιφανειών (Kregiel & Niedzielska, 2014).

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα οι οργανοσιλάνες φάνηκε να επηρεάζουν την προσκόλληση των *S. Typhimurium* και *E. coli* στις τροποποιημένες γυάλινες επιφάνειες, αλλά αυτή η επίδραση δεν ήταν ορατή στις επιφάνειες ανοξειδώτου χάλυβα. Η αξιοσημείωτη αλλαγή των φυσικών ιδιοτήτων της γυάλινης επιφάνειας από υδρόφιλη σε υδρόφοβη πιθανόν να εξηγεί τη μείωση της προσκόλλησης στις επιστρωμένες επιφάνειες. Η χαμηλότερη επιφανειακή τάση της επιφάνειας και η νανοδομημένη

μορφολογία της επίστρωσης πιθανόν να οδήγησε στο χαμηλότερο πληθυσμό των προσκολληθέντων κυττάρων (Chen et al., 2013).

Σημαντικές μειώσεις στο σχηματισμό βιοϋμενίου (24, 48 h) ανιχνεύθηκαν για τα *S. aureus*, *S. Typhimurium* και *Y. enterocolitica* όσον αφορά τις τροποποιημένες με οργανοσιλάνες επιφάνειες του ανοξειδωτού χάλυβα σε σύγκριση με τις πρότυπες επιφάνειες. Θετική συσχέτιση μεταξύ της υδροφοβικότητας της επιφάνειας και της αποκόλλησης των βιοϋμενικών κυττάρων παρατηρήθηκε κι από άλλες μελέτες. Σύμφωνα με αυτή την άποψη τα βακτήρια που προσκολλώνται σε υδρόφοβα υλικά απομακρύνονται πιο εύκολα από αυτές τις επιφάνειες (Bos et al., 2000, Eginton et al., 1995, Gómez-Suárez et al., 2001, Harkes et al., 1992, Reid et al., 1993). Αντιθέτως, ο *S. aureus* βρέθηκε να προσκολλάται πιο αποτελεσματικά στον ανοξειδωτο χάλυβα σε σχέση με το γυαλί. Ομοίως, οι οργανοσιλάνες φάνηκε να αυξάνουν την προσκόλληση του *S. aureus* στις τροποποιημένες γυάλινες επιφάνειες σε σχέση με τις πρότυπες. Παρατηρείται λοιπόν μια θετική συσχέτιση μεταξύ της υδροφοβικότητας και του αριθμού των προσκολλημένων κυττάρων που ανακτήθηκαν από τις επιφάνειες. Η επίστρωση με οργανοσιλάνες δεν είχε καμία επίδραση ως προς την προσκόλληση και το σχηματισμό του βιοϋμενίου της *L. monocytogenes* ανεξαρτήτως χρόνου και υλικού επιφανείας. Καμιά διαφορά επίσης δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των τροποποιημένων με οργανοσιλάνες και των πρότυπων επιφανειών. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία και με άλλες μελέτες, όπως των Teixeira et al. (2007) στην οποία η προσκόλληση της *L. monocytogenes* σε αβιοτικές επιφάνειες δεν επηρεάστηκε από την υδροφοβικότητα και την τραχύτητα του υποστρώματος.

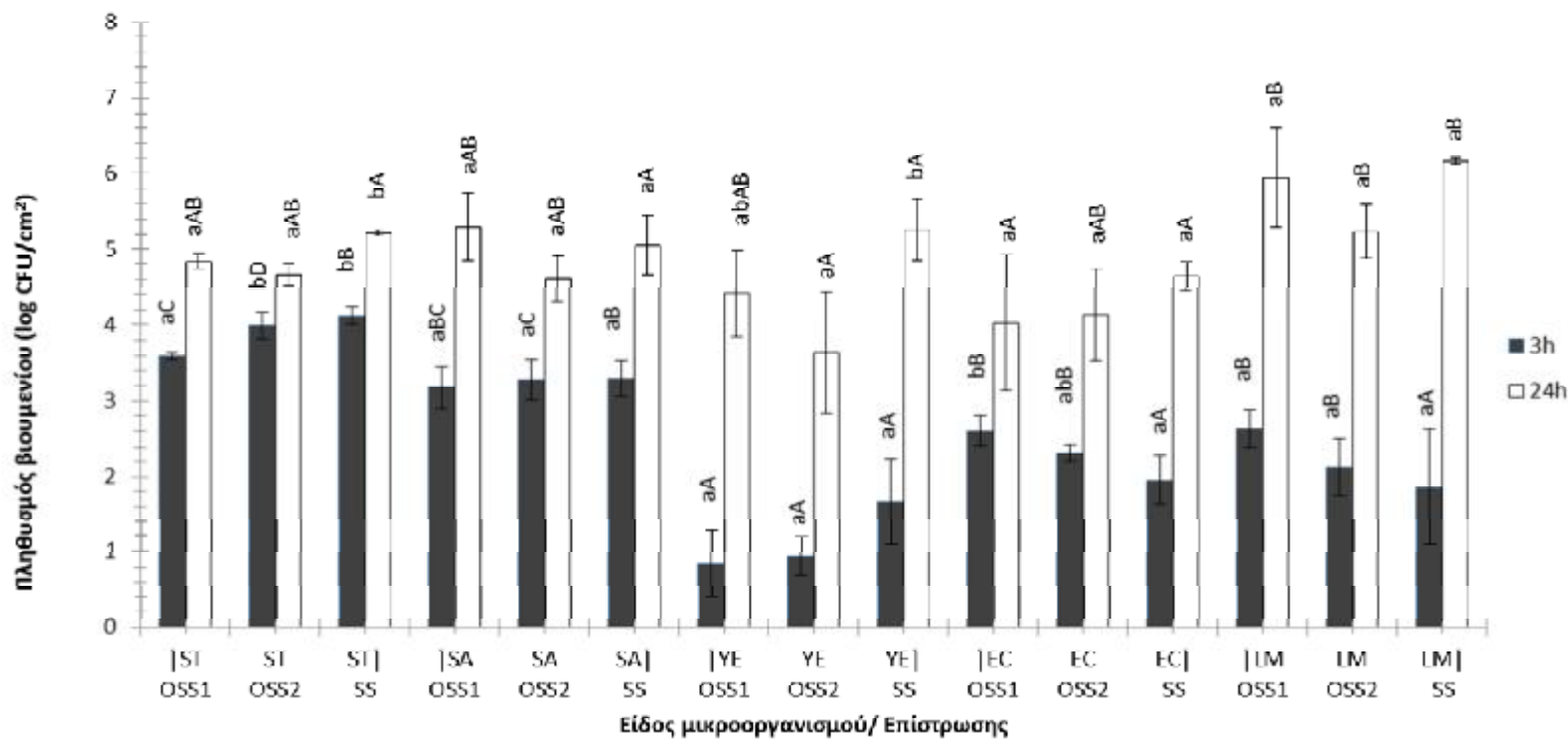
Σχηματισμός βιοϋμενίου σε γυάλινες επιφάνειες



Διάγραμμα 38. Πληθυσμός βιοϋμενίου ± τυπική απόκλιση (log CFU/ cm²) σε γυάλινες επιφάνειες με νανοεπίστρωση (OSG1/OSG2) ή χωρίς (G) από καλλιέργειες 2 στελεχών *S.Typhimurium* (ST), *S. aureus* (SA), *Y. enterocolitica* (YE), *E. coli* O157:H7 (EC) και *L. monocytogenes* (LM) και καταμέτρηση στις 3 h (γκρι) και 24 h (άσπρες μπάρες) και επώασης στους 37 °C.

Διαφορετικά πεζά γράμματα (a,b) αφορούν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο βιοϋμενικό πληθυσμό ανάμεσα στις δύο νανοεπίστρωσεις/πρότυπο και αφορούν τον ίδιο χρόνο επώασης ($P < 0,05$). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα (A, B) αφορούν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο βιοϋμενικό πληθυσμό ως προς τα παθογόνα για το ίδιο είδος επίστρωσης και αφορούν τον ίδιο χρόνο επώασης ($P < 0,05$).

Σχηματισμός βιοϋμενίου σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα



Διάγραμμα 39. Πληθυσμός βιοϋμενίου ± τυπική απόκλιση σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα με νανοεπίστρωση (OSS1/OSS2) ή χωρίς (SS) από καλλιέργειες 2 στελεχών *S. Typhimurium* (ST), *S. aureus* (SA), *Y. enterocolitica* (YE), *E. coli* O157:H7 (EC) και *L. monocytogenes* (LM) και καταμέτρηση στις 3 (γκρι) και 24 h (άσπρες μπάρες) επώασης στους 37 °C. Διαφορετικά πεζά γράμματα (a,b) αφορούν στατιστικές σημαντικές διαφορές στο βιοϋμενικό πληθυσμό ανάμεσα στις δύο νανοεπίστρωσεις/πρότυπο και αφορούν τον ίδιο χρόνο επώασης ($P < 0,05$). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα (A, B) αφορούν στατιστικές σημαντικές διαφορές στο βιοϋμενικό πληθυσμό ως προς τα παθογόνα για το ίδιο είδος επίστρωσης και αφορούν τον ίδιο χρόνο επώασης ($P < 0,05$).

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή επέδειξε αντι-προσκολλητική και αντι-βιοϋμενική δραστηριότητα συγκεκριμένων προϊόντων οργανοσιλανών, αλλά οι δραστηριότητες αυτές εξαρτώνταν άμεσα από το είδος των παθογόνων που χρησιμοποιήθηκαν και το χρόνο επώασης αλλά και το είδος της επιφάνειας που εφαρμόστηκαν. Περαιτέρω μελέτες πρέπει να διεξαχθούν ώστε να μελετηθούν οι μηχανισμοί δράσης των οργανοσιλανών και σε άλλες επιφάνειες και άλλα είδη μικροοργανισμών. Τα νανοϋλικά και οι τροποποίηση των επιφανειών επεξεργασίας τροφίμων θα μπορούσαν να προσφέρουν σημαντικά οφέλη στην καταπολέμηση των βιοϋμενίων σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες τεχνικές καθαρισμού και απολύμανσης.

Ωστόσο, πιθανοί κίνδυνοι για τους καταναλωτές όσον αφορά την εφαρμογή, τη χρήση και τη τελική διάθεση των νανοϋλικών θα πρέπει να αποτιμηθούν, ώστε να διασφαλισθεί η δημόσια υγεία (Contado, 2015). Η έκθεση των καταναλωτών σε νανοσωματίδια μέσω της άμεσης επαφής με ιατρικά εμφυτεύματα ή της έμμεσης μετανάστευσης τους από τις επιφάνειες στα τρόφιμα θα πρέπει να προσδιοριστεί, καθώς υπάρχει κενό γνώσης σχετικά με την απορρόφηση, τον μεταβολισμό και την αποβολή τους από το ανθρώπινο σώμα.

Γενικά συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η παρούσα διδακτορική διατριβή υπογραμμίζει τη θετική επίπτωση στην ασφάλεια τροφίμων και κατά συνέπεια στη μείωση των τροφολοιμώξεων που μπορεί να έχει η υιοθέτηση και η εφαρμογή, από μέρους των καταναλωτών, ασφαλών πρακτικών χειρισμού τροφίμων και επαρκών διαδικασιών καθαρισμού/ απολύμανσης. Η περαιτέρω εκπαίδευση των καταναλωτών ως προς τις συγκεκριμένες λανθασμένες πρακτικές που ανιχνεύθηκαν μέσω του ερωτηματολογίου (π.χ. πρόληψη σε θέματα τήρησης ψυχρής αλυσίδας, πρόληψη διασταυρούμενης επιμόλυνσης) που θα απευθύνονται σε ομάδες που είτε συγκέντρωσαν χαμηλό πληθυσμό σε σχέση με το σύνολο (π.χ. απόφοιτοι λυκείου, οικιακά) είτε εμφάνισαν υψηλότερο ποσοστό τροφολοιμώξεων (π.χ. φοιτητές, άτομα <29 ετών, άτομα που είχαν στην οικογένεια τους μέλος > 60 ετών) θα αποτελούσε μια στρατηγική μείωσης του κινδύνου τροφολοιμώξεων.

Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε η βακτηριακή μεταφορά μεταξύ τροφίμων ζωικής προέλευσης ή ζωικής-φυτικής προέλευσης και αποδείχθηκε ότι αποτελεί μια πολύ-παραγοντική διαδικασία που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και τις αλληλεπιδράσεις τους. Συγκεκριμένα, το υλικό της επιφάνειας, π.χ. οι ξύλινες επιφάνειες (που χρησιμοποιούν το 38,6% των καταναλωτών) δεδομένου της αυξημένης βακτηριακής μεταφοράς στα τρόφιμα από τις επιφάνειες και της δυσκολίας καθαρισμού/ απολύμανσης των επιφανειών σε σχέση με τα άλλα υλικά επιφανειών που ελέγχθησαν η χρήση τους θα πρέπει να αποφεύγεται σε περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων. Η χρήση νερού και απορρυπαντικού ή η χρήση απολυμαντικού σπρέι ήταν αποτελεσματικοί μέθοδοι για τη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στις επιφάνειες προλαμβάνοντας τη διασταυρούμενη επιμόλυνση και τη μεταφορά του παθογόνου στις ντομάτες. Ωστόσο, καθώς μεγάλο ποσοστό των επιφανειών που το παθογόνο ήταν κάτω από το όριο αρίθμησης βρέθηκαν θετικές μετά τον εμπλουτισμό συστήνεται η χρήση διαφορετικών πάγκων και εργαλείων κοπής μεταξύ ωμών τροφίμων ζωικής προέλευσης και τροφίμων που θα καταναλωθούν άμεσα χωρίς περαιτέρω επεξεργασία (π.χ. ντομάτες).

Επιπλέον, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ ειδών και στελεχών βακτηρίων σε μικτά βιοϋμένια που πιθανόν να ανευρίσκονται σε χώρους επεξεργασίας τροφίμων, ως

σημαντικός παράγοντας κατά τη διασταυρούμενη επιμόλυνση. Τέλος, εκτιμήθηκε η αποτελεσματικότητα απολυμαντικών και νανοεπιστρώσεων ως κύριες στρατηγικές πρόληψης και καταπολέμησης των βιοϋμενίων παθογόνων μικροοργανισμών. Παρατηρήθηκε, μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα του χλωριούχου βενζαλκόνιου ως προς τη *S. Typhimurium* σε σχέση με τον *S. aureus* στις μονοκαλλιέργειες (πιθανή ύπαρξη αντλίας efflux που οδηγεί στο αντοχή στα απολυμαντικά) και αύξηση της διακύμανσης της αποτελεσματικότητας του υπεροξικού οξέος στο *S. aureus* παρουσία της *S. Typhimurium*. Οι νανο-επιστρώσεις είχαν ανασταλτική επίδραση στην προσκόλληση και στο σχηματισμό βιουμενίου (κυρίως ως προς τη *S. Typhimurium*). Ωστόσο, παρατηρήθηκε και σε ορισμένες περιπτώσεις αύξηση της προσκόλλησης (π.χ. *S. aureus* στο γυαλί, *E. coli* O157:H7 στον ανοξείδωτο χάλυβα). Καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε στη *L. monocytogenes*, πιθανόν λόγω του γεγονότος ότι η προσκόλληση της δεν εξαρτάται άμεσα από τη διαβρεκτικότητα της επιφάνειας και εξαιτίας της ομοιόμορφης κατανομής του βακτηρίου σε όλη την αβιοτική επιφάνεια.

Μελλοντικές προτάσεις

Τα στοιχεία που λήφθηκαν από το ερωτηματολόγιο θα μπορούσαν να ενσωματωθούν σε μια ιστοσελίδα όπου θα υπήρχαν κανόνες ασφαλούς χειρισμού των τροφίμων σε τρόπο εύληπτο για το κοινό και με εικόνες ώστε να προσεγγίζει τις νεανικές ομάδες. Επίσης ο καταναλωτής θα μπορούσε να ελέγξει τις γνώσεις του και τις πρακτικές του με τη χρήση του ερωτηματολογίου και να εντοπίσει μόνος του μετά από προσωπική αναφορά των αποτελεσμάτων του πιθανές αστοχίες και τρόπους για να τις διορθώσει. Τα δεδομένα αυτά θα συλλέγονται από τις απαντήσεις θα προέκυπταν με δυναμική ανάλυση τα κενά από λανθασμένους χειρισμούς των καταναλωτών και οι ανάγκες για εκπαίδευση. Επιπλέον, το ερωτηματολόγιο αυτό αφορούσε κυρίως τον χειρισμό τροφίμων ζωικής προέλευσης. Ωστόσο υπάρχει ανάγκη από τον USDA η καταγραφή οδηγιών για τον χειρισμό τροφίμων φυτικής προέλευσης από την παραγωγή ως την κατανάλωση. Ο τρόπος με τον οποίο χειρίζονται οι καταναλωτές τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης, ώστε να προκύψουν οι αντίστοιχες οδηγίες θα μπορούσε επίσης να προκύψει από ερωτηματολόγιο. Επίσης, όσον αφορά τις μυκοτοξίνες τόσο η διερεύνηση των υπάρχουσών γνώσεων των καταναλωτών όσο και η πιθανότητα ενημέρωσης τους για τους τρόπους πρόληψης της πρόσληψης και τους πιθανούς κινδύνους από την κατανάλωση τροφίμων με μυκοτοξίνες θα μπορούσε να μελετηθεί.

Όσον αφορά φαινόμενα διασταυρούμενης επιμόλυνσης φέτες κασεριού ή αλλαντικών θα μπορούσαν να επιμολυνθούν με σπόρια μυκήτων (π.χ. *Aspergillus flavus*) και μέσω της διόδου τους από την μηχανή κοπής να επιμολύνουν διαδοχικές φέτες (π.χ. 10) και εν συνεχεία να συσκευαστούν και να συντηρηθούν ώστε να διερευνηθεί το ποσοστό μεταφοράς των σπορίων, η εκβλάστηση των σπορίων υπό συγκεκριμένες συνθήκες και η παραγωγή μυκοτοξινών. Όσον αφορά τα μικτά βιουμένια θα μπορούσαν να διερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων σε συνδυασμό με ζύμες/ μύκητες και η επίδραση κοινών απολυμαντικών (π.χ. χλωριούχο βενζαλκόνιο). Ακόμη, όσον αφορά τα νανοϋλικά για τις επιφάνειες καθώς κάποια από αυτά περιέχουν απολυμαντικά (π.χ. quaternary ammonium organosilanes) θα πρέπει να ελεγχθεί η πιθανή αντιμικροβιακή αντοχή που πιθανόν να αναπτύσσουν τα βακτήρια ως προς αυτές τις νανοεπιστρώσεις. Τέλος, η χρήση των νανο-επιστρώσεων και εν συνεχεία η εφαρμογή απολυμαντικών θα

εξήγαγε αποτελέσματα ως προς την αλληλεπίδραση τους και πιθανή συνδυαστική δράση τους.

Βιβλιογραφία

- Aarnisalo, K., Sheen, S., Raaska, L., & Tamplin, M. (2007). Modelling transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of “gravad” salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 118:69–78.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol*, 196:453-72.
- Abrishami, S. H., Ben, D., Bruursema, Thomas, J., Epstein, P. S., Shah, D. B. (1994). Bacterial adherence and Viability on cutting board surfaces. *Journal of Food Safety*, 14:153–172.
- Ackers, M. L., Schoenfeld, S., Markman, J., Smith, M. G., Nicholson, M. A., DeWitt, W., Cameron, D. N., Griffin, P. M. & Slutsker, L. (2000). An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurized milk. *J. Infect. Dis.*, 181:1834-1837.
- Adams, L. K., Lyon, D. Y., & Alvarez, P. J. J. (2006). Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40:3527–32.
- Aiello, A. E., Coulborn, R. M., Perez, V., & Larson, E. L. (2008). Effect of hand hygiene on infectious disease risk in the community setting: a meta-analysis. *American Journal of Public Health*, 98:1372–1381.
- Albrecht, J. A. (1995). Food safety knowledge and practices of consumers in the USA. *J. Consumer Stud. Home Econ*, 19:119–134.
- Ali, M., Verrill, L., & Zhang, Y. (2014). Self-Reported Hand Washing Behaviors and Foodborne Illness: A propensity Score matching approach. *Journal of Food Protection*, 77:352-358.
- Altekruse, S. F., Street, D. A., Fein, S. B., & Levy, A. (1996). Consumer knowledge of foodborne microbial hazards and food handling practices. *Journal of Food Protection*, 59:287–294.
- Altekruse, S. F., Yang, S., Babagaleh, T. B., & Angulo, F. (1999). A multistate survey of consumer food-handling and food-consumption practices. *American Journal of Preventive Medicine*, 16:216-221.
- American Dietetic Association/Foundation, ConAgra Foundation. (1999). Home Food Safety Benchmark Survey; The American Dietetic Association: Chicago, IL, USA.
- Andersen, J. K. (1988). Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *International Journal Food Microbiology*, 7:193-202.
- Andersen, J. K., Sørensen, R., & Glensbjerg, M. (1991). Aspects of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review. - *International Journal of Food Microbiology*, 13: 231-237.
- Anderson, J. B., Gee, E., Mendenhall, V. T., Shuster, T. A., Hansen, K., & Volk, A. (2004). A camera’s view of consumer food handling and preparation practices. *Journal of the American Dietetic Association*, 104:186–191.

- Andrade, N. J., Ajão, D. B., Zottola, E. A. (1998). Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium* cells. *Journal of Food Protection*, 61:1454–1458.
- Angelillo, I. F., Foresta, M. R., Scozzafava, C., & Pavia, M. (2001). Consumers and foodborne diseases: knowledge, attitudes and reported behavior in one region of Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 64:161-166.
- Anonymous (1994). Foodborne Pathogens. Council for Agricultural Science and Technology. Task force report 122:11–12. Ames, IA.
- Araújo, P., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., & Simões, M. (2011). Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 3: 826–834.
- Argudin, M. A., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2:1751–1773.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, & S. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: Estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, 130:33–40.
- Ashton, L. V., Geornaras, I., Stopforth, J. D., Skandamis, P. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., Smith, G. C., & Sofos, J. N. (2006). Fate of inoculated *Escherichia coli* O157:H7, cultured under different conditions, on fresh and decontaminated beef transitioned from vacuum to aerobic packaging. *Journal of Food Protection*, 69:1273–1279.
- Aygen, G. F. (2012) Safe Food Handling: Knowledge, Perceptions, and Self-Reported Practices of Turkish Consumers, *International Journal of Business and Management*, 7:1-11.
- Azeredo, J., Cerca, N., Henriques, M., & Pereira, M. (2004). Advanced techniques in Biofilms. Chapter 1. University of Minho. Centre of Biological Engineering.
- Bae, Y. M., Baek, S. Y., & Lee, S. Y. (2012). Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 153:465–473.
- Baffone, W., Sorgente, G., Campana, R., Patrone, V., Sisti, D., & Falcioni, T. (2011). Comparative effect of chlorhexidine and some mouthrinses on bacterial biofilm formation on titanium surface. *Current Microbiology*, 62:445–51.
- Bagge-Ravn, D., Hjelm, M, Christiansen, J. N., Johansen, C. et al. (2003) The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 239-250.
- Barraud, N., et al. (2009). Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *Journal of Bacteriology*, 191:7333–7342.
- Beddows, C. (1983). Chicken research. *Home Econ.* 1:28–30.

- Belessi, C., Gounadaki, A. S., Psomas, A., & Skandamis, P. (2011). Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 1:25.
- Bell, C., & Kyriakides, A. (2002). *Salmonella* In Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control. Ed. Blackburn C. & McClure P., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Benamara, H., Rihouey, C., Jouenne, T., & Alexandre, S. (2011). Impact of the biofilm mode of growth on the inner membrane phospholipid composition and lipid domains in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta*, 1:98–105.
- Berends, B. R., Van Knapen, F., Mossel, D. A. A., Burt, S. A. and Snijders, J. M. A. (1998) Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in the Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 44:219–229.
- Bernbom, N., Jørgensen, R. L., Arpanaei, A., Meyer, R.L., Kingshott, P., Vejborg, R.M., Klemm, P., & Gram, L. (2009). Adhesion of foodborne bacteria to stainless steel is reduced by food conditioning films. *Journal of Applied Microbiology*, 106:1268-1279.
- Besinis, A., De Peralta, T., & Handy, R. D. (2014). The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. *Nanotoxicology*, 8:1–16.
- Beumer, R. R., Bloomfield, S., Exner, M., Fara, G. M., & Scott, E. (1999). The need for home hygiene policy and guidelines on home hygiene. *Ann Ig*, 11:11-26.
- Beumer, R. R., TeGiffe, M. C., Spoorenbert, E., & Rombouts, F. M. (1997). *Listeria* species in domestic environments. *Epidemiology and Infection*, 117:437–442.
- Bhattacharjee, A. K., & Perez-Conde J. (2003). Optical Properties of semiconductor nanocrystals: A symmetry-based tight-binding approach. *Revista Mexicana de Fisica* 49, 168-171(2003).
- Bhowmick, P. P., Devegowda, D., Ruwandeepika, H. A., Fuchs, T. M., Srikumar, S., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2011). *gcpA* (stm1987) is critical for cellulose production and biofilm formation on polystyrene surface by *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in both high and low nutrient medium. *Microbial Pathogenesis*, 50:114–122.
- Black, R. E., Jackson, R. J., Tsai, T., Medvesky, M., Shayegani, M., Feeley, J. C., MacLeod, K. I. and Wakelee, A. M. (1978). Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N. Engl. J. Med*, 298:76-79.
- Blackman, I. C., & Frank, J. F. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, 59:827–831.
- Block, S.S., (2001) Peroxygen Compounds. In: Block SS, ed. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 5th ed. Philadelphia, PA 19106 USA: Lippincott Williams & Wilkins, 185–204.
- Bloomfield, S. F., & Scott, E. (1997). Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants. *Journal of Applied Microbiology*, 83:1–9.

- Bloomfield, S. F., Aiello, A. E., Cookson, B., O'Boyle, C., & Larson, E. L. (2007). The effectiveness of hand hygiene procedures in reducing the risks of infections in home and community settings including handwashing and alcohol-based hand sanitizers. *American Journal of Infection Control*, 35:27-64.
- Bokranz, W., Wang, X., Tschäpe, H., & Römling, U. (2005). Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 1171–1182.
- Boles, B.R., McCarter, L.L. (2002). *Vibrio parahaemolyticus* scrABC, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. *J. Bacteriol.* 184:5946 –5954.
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J. P., Tsunemi, M. H., & Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35:386–391.
- Boodhu, A., Badrie, N., & Sookdhan, J. (2008). Consumers' perceptions and awareness of safe food preparation practices at homes in Trinidad, West Indies. *International Journal of Consumer Studies*, 32:41-48.
- Bos, R., Mei, H. C., Gold, J., & Busscher, H. J. (2000). Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 189:311–315.
- Bottone, E. J. (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 1:323-333.
- Bourion, F., & Cerf, O. (1996). Disinfection efficacy against pure-culture and mixed-populations biofilms of *Listeria innocua* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, Teflon and rubber. *Sci. Aliments*, 16:151–166.
- Bouwmeester, H., Brandhoff, P., Marvin, H. J. P., Weigel, S. and Peters, R. J. B. (2014) State of the safety assessment and current use of nanomaterials in food and food production. *Trends in Food Science & Technology*, 40:200–210.
- Boyce, J. M., Havill, N. L., Guercia, K. A., Schweon, S. J., & Moore, B. A. (2014). Evaluation of two organosilane products for sustained antimicrobial activity on high-touch surfaces in patient rooms. *American Journal of Infection Control*, 42:326–8.
- Brewer, M., & Rojas, M. (2008) Consumer attitudes toward issue in food safety. *Journal of Food Safety* 28:1–22.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2011b). Comparative biocidal activity of peracetic acid, benzalkonium chloride and ortho phthalaldehyde on 77 bacterial strains. *J Hosp Infect.* 78:208-13.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2011a). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review, *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 27: 1017-1032.

- Bridier, A., del Pilar Sanchez-Vizueté, M., Le Coq, D., Aymerich, S., Meylheuc, T., Maillard, J.-Y., et al. (2012). Biofilms of a *Bacillus subtilis* hospital isolate protect *Staphylococcus aureus* from biocide action. *PLoS ONE* 7:e44506.
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., & Briandet, R. (2010). The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J. Microbiol. Methods*, 82:64–70.
- Bruhn, C. M., & Schutz, H. G. (1999). Consumer food safety knowledge and practices. *Journal of Food Safety*, 19(1), 73-87.
- Bryan, F. (1988). Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. *Journal of Food Protection*, 51:663–673.
- Buchholz, A.L., Davidson, G.R., Marks, B.P., Todd, E.C.D., & Ryser, E.T., (2012). Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 from equipment surfaces to fresh-cut leafy greens during processing in a model pilot-plant production line with sanitizer-free water. *Journal of Food Protection*, 75:1920–1929.
- Buckingham-Meyer, K., Goeres, D.M., & Hamilton, M. A. (2007). Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. *J Microbiol Methods*, 70:236–244.
- Buffer, J., Kendall, P., Medeiros, L.C., Schroeder, M., Sofos, J. (2013). Nutrition and dietitians differ in food safety information provided to highly susceptible clients. *J. Nutr. Educ. Behav.*, 45:102–108.
- Burmølle, M., et al. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol*, 72:3916–3923
- Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., & Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:3916–3923.
- Byrd-Bredbenner, C., Maurer, J., Wheatley, V., Cottone, E., Clancy, M. (2007a). Observed food safety behaviors and skills of young adults. *British Food Journal*, 107:519–530.
- Byrd-Bredbenner, C., Maurer, J., Wheatley, V., Cottone, E., Clancy, M. (2007b). Food safety hazards lurk in the kitchens of young adults. *Journal of Food Protection* 70:991–996.
- Camilli, A., Bassler, B.L., (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311:1113–1116.
- Canadian Food Inspection Agency. (1998). Safe food handling study. Report no. PN4242. Environics Research Group, Toronto.
- Carlson, A., Kinsey, J., Nadav, C. (2002). Consumers' retail source of food: A cluster analysis. *Fam. Econ. Nutr. Rev.*, 14:11–20.

- Carpentier, B., & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75:499-511.
- Carpentier, B., & Chassaing, D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, 97:111–122.
- Castonguay M.H., et al. 2006. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Res. Microbiol.*, 157:471–478.
- Centers for Disease Control and Prevention. CDC (2002). Outbreak of *Salmonella* Javiana Infections. <http://www.cdc.gov>. Accessed on April, 2016.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2008. An Ounce of Prevention Keeps the Germs Away Seven Keys to a Safer Healthier Home. http://www.cdc.gov/ounceofprevention/docs/ooop_brochure_eng.pdf. Accessed on April, 2016.
- Centers for Disease Control and Prevention. CDC (2011). Vital signs. Making Food Safer to Eat. Available at: <http://www.cdc.gov/vitalsigns/FoodSafety/>. Accessed on February, 2016.
- Centers for Disease Control and Prevention. CDC (2012). Summary of notifiable diseases - United States, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 59:1–111.
- Centers for Disease Control and Prevention. CDC (2013). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks—United States, 1998–2008. *MMWR*. 62:1–34.
- Cerf, O., Carpentier, B., & Sanders, P. (2010) Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: “resistance” has different meanings. *International Journal of Food Microbiology* 136:247–254.
- Chai, L.C., Lee, H.Y., Ghazali, F.M., Bakar, F.A., Malakar, P.K., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y., & Radu, S., (2008). Simulation of cross-contamination and decontamination of *Campylobacter jejuni* during handling of contaminated raw vegetables in a domestic kitchen. *Journal of Food Protection*, 71:2448–2452.
- Chaves Simões, L., Simões, M., & JoãoVieira, M. (2010). Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. *Applied and Environmental Microbiology* 76:6673-6679.
- Chen, X., & Stewart, P.S. Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction–diffusion interaction. *Environmental Science and Technology*, 1996. 30(6):2078-2083.
- Chen, M., Yu, Q., & Sun, H. (2013). Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 14:18488-501.
- Chen, Y., Jackson, K. M., Chea, F. P., & Schaffner, D. W. (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection*, 64:72-80.

- Cherchi, C., & Gu, A.Z. (2011). Effect of bacterial growth stage on resistance to chlorine disinfection. *Water Sci Technol*, 64:7-13.
- Chia, T., Goulter, R., McMeekin, T., Dykes, G., & Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in apoultry processing plant. *Food Microbiology*, 26:853-859.
- Chmielewski, R., & Frank, J. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2:22-32.
- Chorianopoulos, N., Tsoukleris, D., Panagou, E., Falaras, P., & Nychas, G., (2011) Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysts as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm disinfection in food processing. *Food Microbiology*, 28:164-170.
- Chorianopoulos, N. G., Giaouris, E. D., Skandamis, P. N., Haroutounian, S. A, & Nychas, G.-J. E. (2008). Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology*, 104:1586-96.
- Christensen, S. G. (1979). Isolation of *Yersinia enterocolitica* O:3 from a well suspected as the source of yersiniosis in a baby. *Acta Vet. Scand.*, 20:154-156.
- Clover, D. O. (2006) Cutting boards in *Salmonella* cross-contamination. *J. AOAC Intl.* 89:538-542.
- Cloete, T. E., & Jacobs, L. (2001). Surfactants and the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to 3CR12 stainless steel and glass. *Water SA*, 27:21-26.
- Cody, M., & Hogue, M. (2003). Results of the home food safety—It's in your hands 2002 survey: Comparisons to the 1999 benchmark survey and health people 2010 food safety behaviors objective. *Journal of American Dietetic Association*, 108:1115-1125.
- Cogan, T. A., Slader, J., Bloomfield, S. F., & Humphrey, T. J. (2002) Achieving hygiene in the domestic kitchen: The effectiveness of commonly used cleaning procedures. *Journal of Applied Microbiology*, 92:885-892.
- Cogan, T., Bloomfield, S. F. & Humphrey, T. J. (1999) The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Letters in Applied Microbiology*, 29:354-358.
- Corteston, J., Cheng, G., Geesey, G., Ladd, J., Nickel, M., Dasgupta, M., & Marrie, J., (1987). Bacterial Biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 41:435-464.
- Corteston, J., Lewandowski, D., Cadwell, D., Korber, D., & Lappin-Scot, H. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49:711-745.
- Corteston, J., Lewandowski, D., DeBeer, D., Cadwell, D., Korber, D., & James, G. (1994). Biofilms the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176:2137-2142.
- Costerton, J.W. (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* 1995, 15:137-140

- Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284:1318-1322.
- Cotter PA, Stibitz S. 2007. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:17–23.
- Cousins, B.G., Allison, H.E., Doherty, P.J., Edwards, C., Garvey, M. J., Martin, D. S., & Williams, R.L. (2007). Effects of a nanoparticulate silica substrate on cell attachment of *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 757–65.
- Craven, P.C., Mackel, D.C., Baine, W.B., Barker, W.H., Gangarosa, E.J., Goldfield, M. et al. (1975). International outbreak of *Salmonella* eastbourne infection traced to contaminated chocolate. *Lancet*, 788-793.
- Cronbach, L.J. (1951). Coefficient alpha and the internal structure of tests. *Psychometrika*, 16:297.
- Cummings, K., E. Barrett, J.C. Mohle-Boetani, J.T. Brooks, J. Farrar, T. Hunt, A. Fiore, K. Komatsu, B. Werner and L. Slutsker. (2001). A multi-state outbreak of *Salmonella enterica* serotype baillon associated with domestic raw tomatoes. *Emerging Infectious Diseases*, 7:1046-1048.
- Curtis, V., & Cairncross, S. (2003). Effect of washing hands with soap on diarrhoea risk in the community: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases*, 3:275-281.
- D’Aoust, J.Y. (1985). Infective dose of *Salmonella* Typhimurium in Cheddar cheese – brief report. *American Journal of Epidemiology*, 122:717-720.
- D’Argenio, D.A., Miller, S.I. (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150:2497–2502.
- Da Silva Meira, Q., De Medeiros Barbosa, I., Alves Aguiar Athayde, A., de Siqueira-Junior, J., & de Souza, E., (2012). Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control*, 25:469-475.
- Davies, D.G., Geesey, G.G. (1995). Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:860 –867.
- Davison, W.M., Pitts, B., Stewart, P.S. (2010). Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54:2920–2927.
- Dawkins, H.C., Bolton, F.J. & Hutchinson, D.N. (1984). A study of the spread of *Campylobacter jejuni* in four large kitchens. *Journal of Hygiene*, 92:357-364.
- Dawson, P., Han, I., Cox, M., Black, C., & Simmons, L. (2007). Residence time and food contact time effects on transfer of *Salmonella* Typhimurium from tile, wood and carpet: testing the five-second rule. *Journal of Applied Microbiology*, 102:945-953.

- De Beer D, Srinivasan R, & Stewart PS. (1994). Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied Environmental Microbiology*, 60:4339- 4344.
- De Boer, E. & Hahne, M. (1990). Cross contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. From raw chicken products during food preparation. *Journal of Food Protection* 53, 1067-1068.
- De Jong, A., Verhoeff-Bakkenes, L., Nauta, M., & de Jong, R. (2008) Cross-contamination in the kitchen: Effect of hygiene measures. *Journal of Applied Microbiology*, 105:615–624.
- De Zutter, L., & Van Hoof, J. (1987). Isolation of *Yersinia enterocolitica* from pork meat. *Proceedings of the 33rd International Congress of Meat Science and Technology*., Helsinki. 72-74.
- Department of Health and Social Sciences and Northern Ireland Health and Social Services Board. DHSC & NISSSB (1998). Public knowledge and attitudes to food safety in Northern Ireland. Research Evaluation Services, Belfast, Northern Ireland.
- DeVere, E., & Purchase, D. (2007). Effectiveness of domestic antibacterial products in decontaminating food contact surfaces. *Food Microbiology*, 24:425–430.
- DeWitt, J.C., Broekhuizer, G. & Kamplmacher, E.H. (1979) Cross-contamination during preparation of frozen chicken in the kitchen. *Journal of Hygiene, Cambridge*, 83:27–32.
- Di Bonaventura, G., R. Piccolomini, D. Paludi, V. D'Orio, A. Vergara, M. Conter, & Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104:1552-1561.
- Dickson, J. S., & Daniels, E. K. (1991). Attachment of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* to glass as affected by surface film thickness, cell density, and bacterial motility, 8:281–283.
- Donlan, R.M., (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33:1387-1392.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8:881–890.
- Donlan, R.M. & J.W. Costerton. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15:167-193.
- Doulgeraki, A.I., Paramithiotis, S., & Nychas, G.E., (2011). International Journal of Food Microbiology Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145:77–83.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 149: 262–268.

- Dychdala, G.R., (2001) Chlorine and Chlorine Compounds. In: Block SS, ed. Disinfection, Sterilization, and Preservation. 5th ed. Philadelphia, PA 19106 USA: Lippincott Williams & Wilkins, 135–57.
- Elias, S., & Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 990–1004.
- European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC (2013) Annual Epidemiological Report. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm.
- European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC (2015) Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. Stockholm.
- EFSA (2012) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10:2597.
- EFSA (2013) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 11:3129.
- EFSA & ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13(1):3991
- Eginton, P. J., Gibson, H., Holah, J., Handley, P. S., & Gilbert, P. (1995). Quantification of the ease of removal of bacteria from surfaces. *Journal of Industrial Microbiology*, 15:305–10.
- Ejemot-Nwadiaro, R.I., Ehiri, J.E., Meremikwu, M.M., & Critchley, J.A. (2008). Hand washing for preventing diarrhoea (review). *Cochrane Database Syst. Rev.* 23:CD004265.
- European Food Information Council. EUFIC (2002). Retrieved from <http://www.eufic.org/article/en/food-safety-quality/safe-food-handling/expid/basics-food-safety/>.
- Evenson, M.L., Hinds, M.W., Berstein, R.S., Bergdoll, M.S. (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology*, 7:311–316.
- FAO/WHO. (2002). Statistical Information on Foodborne Disease in Europe: Microbiological and Chemical Hazards; FAO: Budapest, Hungary.
- Farber, J.M., & Peterkin P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55:476–511.
- Farrell, B.L., Ronner, A.B., & Wong, A.C.L. (1998). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef to meat grinders and survival after sanitation with chlorine and peroxyacetic acid. *Journal of Food Protection*, 61:817–822.
- Farrell, B.L., Ronner, A.B., & Wong, A.C.L. (1998). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef to meat grinders and survival after sanitation with chlorine and peroxyacetic acid. *Journal of Food Protection*, 61:817–822.

- Fatemi, P., & Frank, J.F., 1999. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *Journal of Food Protection*, 62:761–765.
- FDA (2012) Bad bug book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook, 2nd ed. US Food and Drug Administration, Silver Spring, p. 87–92. <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm2006773.htm>. Accessed 27 March 2013.
- FDA (2013) FDA's Team Tomato Fights Contamination. Consumer updates sector. FDA.
- Feilberg, A., Tønning, K., Jacobsen, E., Hemmersam, A., Søborg, I., Cohr, K. (2008) Survey and Health Assessment of Possible Health Hazardous Compounds in Proofing Sprays. Environmental Protection Agency, Danish ministry of the environment.
- Ferguson, W.W. & June, R.C. (1952) Experiments on feeding adult volunteers with *Escherichia coli* 111, B4, a coliform organism associated with infant diarrhoea. *American Journal of Hygiene*, 55:155-169.
- Figuroa, G., Navarrete, P., Caro, M., Troncoso, M., & Faundez, G. (2002) Carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food handlers. *Revista Medica De Chile*, 130:859-864.
- Finch, J.E., Prince, J. & Hawksworth, M. (1978) A bacteriological survey of the domestic environment. *Journal of Applied Bacteriology*, 45:357-364.
- Finlay, B.B., & Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61:136-169.
- Fischer, A. R. H., Frewer, L. J., & Nauta, M. J. (2006). Towards improving food safety in the domestic environment: A multi- item Rasch scale for the measurement of the safety efficacy of domestic food handling practices. *Risk Analysis*, 26:1323-1338.
- Fleming, D., & Hunt, D. (Ed.). (2006). *Biological Safety Principles and Practices* (4th ed.). Washington: ASM Press.
- Flores, R.A., Tamplin, M.L., Marmer, B.S., Phillips, J.G., & Cooke, P.H. (2006). Transfer Coefficient Models for *Escherichia coli* O157:H7 on Contacts between Beef Tissue and High-Density Polyethylene Surfaces. *Journal of Food Protection*, 69:1248-1255.
- Folsom, J.P., Richards, L., Pitts, B., Roe, F., Ehrlich, G.D., Parker, A., Mazurie, A. & Stewart, P. S. (2010) Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis, *BMC Microbiol.* BioMed Central Ltd, 10:294.
- Food and Drink Federation. FDF (1996). The FDF-IEHO national food safety report. Foodlink, London.
- Food Marketing Institute. FMI (2011). U.S. Grocery Shopper Trends 2011; Food Marketing Institute: Arlington, VA, USA, 2011.
- Food Safety Authority of Ireland. FSAI (1998). Public knowledge and attitudes to food safety in Ireland. Research and Evaluation Services, Dublin.

- Foong, S.C.C., & Dickson, J.S. (2004). Attachment of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. *Journal of Food Protection*, 67:456-462.
- Frank, J.F. (2001). Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Advances in Food and Nutrition Research*, 43:319-370.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Korte, T. & Korkeala, H. (2001). Transmission of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 to pets via contaminated pork. *Letters in Applied Microbiology*, 32:375-8.
- Frewer, L., Shepherd, R., Sparks, P. (1994). The interrelationship between perceived knowledge, control, and risk associated with a range of food-related hazards targeted at the individual, other people, and society. *Journal of Food Safety*, 14:19-40.
- Galvão, N.N., Chiarini, E., Destro, M.T., De Aguiar Ferreira, M., & Nero, L.A. (2012). PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. *Meat Science*, 92:635-643.
- Gamble, R., & Muriana, P. M. (2007). Microplate fluorescence assay for measurement of the ability of strains of *Listeria monocytogenes* from meat and meat-processing plants to adhere to abiotic surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5235-5244.
- Garrett, T.R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18:1049-1056.
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., & Staley, J.T. (Eds.) (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (2nd ed.). New York: Springer.
- Ghandi, M., & Chikindas, M.L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113:1–15.
- Gianotti, A., Serrazanetti, D., Sado Kamdem, S., Guerzoni, M. (2008). Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 123:9–17.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Skandamis, P., & Nychas, G., (2012) Attachment and biofilm formation by *Salmonella* in food processing environments. In *Salmonella—A Dangerous Foodborne Pathogen*, eds. B. S. M. Mahmoud, pp. 157–180. Rijeka, Croatia: Intech.
- Giaouris, E.D., & Nychas, G.-J.E. (2006). The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air–liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*, 23:747–752.
- Giaouris, E., Chapot-Chartier, M.-P., & Briandet, R. (2009). Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *International Journal of Food Microbiology*, 131:2-9.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., & Nychas, G.-J.E. (2005). Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *Journal of Food Protection*, 68:2149-2154.

- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., & Nychas, G.-J.E. (2013). Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. *PloS One*, 8:e77276.
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., ... Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6: 841.
- Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E., & Holah, J.T. (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87:41-48.
- Gilbert, S.E., Whyte, R., Bayne, G., Paulin, S.M., Lake, R.J., & Van der Logt, P. (2007). Survey of domestic food handling practices in New Zealand. *International Journal of Food Microbiology*, 117:306-311.
- Gill, O.N., Bartlett, C.L.R., Sockett, P.N. & Tostowaryk, W. (1988). Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and non-porous inanimate surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 26:1513-1518.
- Gjermansen, M., Ragaw, P., Sternberg, C., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T., (2005). Characterization of starvation induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Microbiology*, 7:894-904.
- Gleiter, H., Proc Second Riso Int. symposium on metallurgy and Materials science, edited by N. hansen, T. Leffels and H. Lilholt, Roskilde (1981) pp15-21.
- Goller, C.C., & Romeo, T. (2008). Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322:37-66.
- Gómez-Suárez, C., Busscher, H. J., & van der Mei, H. C. (2001). Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:2531-2537.
- Gong, S. L., Yang, Y. S., Shen, H., Wang, X. Y., Guo, H. P., & Bai, L. (2011). Meat handling practices in households of Mainland China. *Food Control*, 22:749-755.
- Gorman, R., S. Bloomfield, & C. Adley. (2002). A study of cross- contamination of foodborne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *International Journal of Food Microbiology*, 76:143–150.
- Götz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, 43:1367–1378.
- Gough, N.L., & Dodd, C.E.R. (1998). The survival and disinfection of *Salmonella* Typhimurium on chopping board surfaces of wood and plastic. *Food Control*, 9:363–368.
- Goulter, R.M., Gentle, I.R., Dykes, G.A. (2009). Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Lett. Appl. Microbiol.* 49: 1–7.

- Greene, V.W. (2001). Personal hygiene and life expectancy improvements since 1850:Historic and epidemiologic associations. *American Journal of Infection Control*, 29:203-206.
- Griffith, C.J., Peters, A.C., Redmond, E.C. & Price, P. (1999). Food safety risk scores applied to consumer food preparation and the evaluation of hygiene interventions. Department of Health, London.
- Griffith, C. J., Price, P., Peters, A. C. & Clayton, D. A. (2001). An evaluation evaluation of food handlers knowledge, belief and attitudes about food safety and its interpretation using social cognition models. Food Standards Agency, London.
- Guillier, L, Stahl, V, Hezard, B, Notz, E, & Briandet, R. (2008). Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm micro- flora of smear cheese wooden shelves. *International Journal of Food Microbiology*, 128:51–57.
- Guobjornsdottir, B., Einarsson, H., & Thorkelsson G. (2005). Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: Influence of stainless steel surface finish and presence of gram- negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotechnology*, 43:55–61.
- Guzewich, J., & Ross, M.P. (1999). White paper: evaluation of risks related to microbiological contamination of ready-to-eat food by food preparation workers and the effectiveness of interventions to minimise those risks. College Park (MD): Food and Drug Administration, Centre for Food Safety and Applied Nutrition.
- Habimana, O., Møretro, T., Langsrud, S., Vestby, L.K., Nesse, L.L., & Heir, E. (2010). Micro ecosystems from feed industry surfaces: A survival and biofilm study of *Salmonella* versus host resident flora strains. *BMC Veterinary Research*, 6:48.
- Hair, F., Anderson, R., Tatham, R., & Black, W. (1995), *Multivariate Data Analysis with Readings*, 4th Ed, London, Prentice-Hall International.
- Harkes, G., Dankert, J., & Feijen, J. (1992). Growth of uropathogenic *Escherichia coli* strains at solid surfaces. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 3:403-18.
- Harrison, W.A., Griffith, C.J., Ayers, T., & Michaels, B. (2003) Bacterial transfer and cross-contamination potential associated with paper-towel dispensing. *American Journal of Infectious Control*, 31:387-391.
- Hatakka M., Bjorkroth K.J., Asplund, K., Maki-Petays, N., Korkeala, H.J. (2000) Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. *Journal of Food Protection* ,63:1487-1491.
- Haysom, I.W. & Sharp, A.K. (2005) Bacterial contamination of domestic kitchens over a 24-hour period. *British Food Journal*, 107:453-466.
- Hedburg, C.W., Angulo, F.J., White, K.E., Langkop, C.W., Schell, W.L., Stobierski, M.G., Schutat, A., Besser, J.M., Dietrich, S., Helsen, L., Griffin, P.M., McFarland, J.W., Osterholm M.T. & the Investigation Team. (1999). Outbreaks of salmonellosis associated with eating uncooked tomatoes: Implications for public health. *Epidemiology and Infection*, 122:135-393.

- Hengge, R., (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol*, 7:263–273.
- Hetrick, E.M., Shin, J.H., Paul, H.S., & Schoenfisch, M.H. (2009). Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *Biomaterials*, 30: 2782-9.
- Hilton, A.C., & Austin, E., (2000). The kitchen dishcloth as a source of and vehicle for foodborne pathogens in a domestic setting. *International Journal of Environmental Health and Research*, 10:257-261.
- Hockin, J.C., D’Aoust, J.Y., Bowering, D., Jessop, J.H., Khanna, B., Lior, H. & Milling, M.E. (1989). An international outbreak of *Salmonella* nima from imported chocolate. *Journal of Food Protection*, 52:51-59.
- Hoffmann, S., Batz, M., & Morris, J.G. (2012). Annual Cost of Illness and Quality Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection* 75(7): 1291-1302.
- Hoffmann, S., & Anekwe, T. (2013). Making sense of recent cost of foodborne illness estimates. *Economic Information Bulletin*, 18 <http://www.ers.usda.gov/amber-waves/2013-november>.
- Holah, J.T., Higgs, C., Robins, S., Worthington, D., & Spencely, H. (1990). A conductance based surface disinfection test for food hygiene. *Letters in Applied Microbiology*, 11:255-259.
- Hood, S.K., & Zottola, E.A. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37:145-153.
- Hoyle, B.D., & Costerton, J.W. (1991). Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in Drug Research. Fortschritte Der Arzneimittelforschung. Progrès Des Recherches Pharmaceutiques*, 37:91-105.
- Humphrey, T.J., Martin, K.W. & Whitehead, A. (1994) Contamination of hands and work surfaces with *Salmonella* Enteritidis PT4 during the preparation of egg dishes. *Epidemiology and Infection*, 113:403-409.
- Huovinen, E., Sihvonen, L.M., Virtanen, M.J., Haukka, K., Siitonen, A. & Kuusi, M. (2010) Symptoms and sources of *Yersinia enterocolitica*-infection: a case-control study., *BMC infectious diseases*, 10:122.
- ICMSF (1996) *Staphylococcus aureus*. Ch 17 In: *Microorganisms in food 5: Microbiological specifications of food pathogens*. Blackie Academic and Professional, London, p. 299-333.
- IFH. 2004. Recommendations for suitable hygiene procedures for use in the domestic environment. Intramed Communications, Milan, Italy.
- Ikawa, J.Y., & J.S. Rossen. (1999). Reducing bacteria in household sponges. *Journal of Environmental Health*, 62:18-22.
- Jackson, L.A., Keene, W.E., McAnulty, J.M. et al. (2000). Where's the Beef? The Role of Cross-contamination in 4 Chain Restaurant–Associated Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 in the Pacific Northwest. *Archives of internal Medicine Journal*, 160:2380-2385.

- Jahid, I. K., Han, N., Zhang, C.-Y., & Ha, S.-D. (2015). Mixed culture biofilms of *Salmonella* Typhimurium and cultivable indigenous microorganisms on lettuce show enhanced resistance of their sessile cells to cold oxygen plasma. *Food Microbiology*, 46:383-394.
- James, G.A., Beaudette, L., Costerton, J.W. (1995). Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15:257-262
- Jay, L.S., Comar, D. & Govenlock, L.D. (1999a). A national Australian food safety telephone survey. *Journal of Food Protection*, 62:921–928.
- Jay, L.S., Comar, D., & Govenlock, L.D. (1999b). A video study of Australian food handlers and food handling practices. *Journal of Food Protection*, 62:1285–1296.
- Jemmi, T., & Stephan, R. (2006). *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 25:571–580.
- Jenal, U. (2004). Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr. Opin. Microbiol.* 7:185–191
- Jessen, B., & Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51:265–279.
- Jevsnik, M., Hoyer, S., & Raspor, P. (2008). Food safety knowledge and practices among pregnant and non-pregnant women in Slovenia. *Food Control*, 19:526–534.
- Jones, K., & Bradshaw, S.B. (1997). Synergism in biofilm formation between *Salmonella* Enteritidis and a nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology*, 82:663-668.
- Jones T., Kellum, M., Porter S., Bell, M., & Schaffner, W. (2002). An outbreak of Community – acquired foodborne illness caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases.*, 8:1.
- Jullien, C., Benezech, T., Le Gentil, C., et al. (2008). Physico-chemical and hygienic property modifications of stainless steel surfaces induced by conditioning with food and detergent. *Biofouling*, 24:163–172.
- Kadam, S., de Besten, H., van der Veen, S., et al., (2013). Diversity assesmant of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165:259-264.
- Kaiser, H.F., & Rice, J. (1974). Little Jiffy, MARK VI, Educational and Psychological Measurement, 34:111 – 117.
- Kaplan J., & Fine D. (2002). Biofilm dispersal of *Neisseria subflava* and other phylogenetically diverse oral bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 68:4943-4950.
- Kara, D., Luppens, S.B.I., & Ten Cate, J.M. (2006). Differences between single and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. *European Journal of Oral Science*, 114:58–63.

- Karabudak, E., Bas, M., & Kiziltan, G. (2008). Food safety in the home consumption of meat in Turkey. *Food Control*, 19:320-327.
- Kart, D., Tavernier, S., Van Acker, H., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2014). Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, 30:377–383.
- Kasimanickam, R.K., Ranjan, A., Asokan, G.V., Kasimanickam, V.R., & Kastelic, J.P. (2013). Prevention and treatment of biofilms by hybrid- and nanotechnologies. *International Journal of Nanomedicine*, 8:2809–2819.
- Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*, 65:1811–1829.
- Keet, E.E. (1974). *Yersinia enterocolitica* septicemia. Source of infection and incubation period identified. *New York State Journal of Medicine*, 74:2226-30.
- Kennedy, K., Jackson, V., Blair, I.S., McDowell, D.A., Cowan, C. & Bolton, D.J. (2005). Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators. *Journal of Food Protection*, 68:1421-1430.
- Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wag Y., & Lewis K. (2004) Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*, 230:13-18.
- Keskinen, L., Todd, E.C.D., & Ryser, E.T. (2008). Transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* from stainless steel knife blades to roast turkey breast. *Journal of Food Protection*, 71:176-81.
- Khambaty, F.M., Bennett, R.W., & Shah, D.B. (1994) Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiology and Infection*, 113:75-81.
- Kim, S.H., & Wei, C.I. (2007). Biofilm formation by multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104 and other pathogens. *Journal of Food Protection*, 70:22-29.
- Kim, T.J., Young, B.M., & Young, G.M. (2008). Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:5466-5574.
- Knabel, S. (1995). Foodborne illness: Role of home food handling practices. Scientific status summary. *Food Technology*, 49:119-131.
- Knight, P.G., Jackson, J.C., Bain, B., & Eldemire-Shearer, D. (2003). Household food safety awareness of selected urban consumers in Jamaica. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 54:309–320.
- Knobben, B.A.S., van der Mei, H.C., van Horn, J.R., Busscher, H.J. (2006). Transfer of bacteria between biomaterials surfaces in the operating room - an experimental study. *Journal of Biomedical Materials Research*, 80:790-799.

- Kohn, J. (1967) Pseudomonas infection in hospital (letter to the Editor). British Medical Journal 4, 548.
- Kostaki, M., Choriantopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G.-J. J., & Giaouris, E. (2012). Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. Applied and Environmental Microbiology, 78:2586-2595.
- Krauss, H., Weber, A., Appel, M., Enders, B., Isenberg, H. D., Schiefer, H. G., Slenczka, W., von Graevenitz, A., & Zahner, H. (Eds.). (2003). Zoonoses Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans (3rd ed.). Washington: ASM press.
- Kregiel, D., & Niedzielska, K. (2014). Effect of plasma processing and organosilane modifications of polyethylene on *Aeromonas Hydrophila* biofilm formation. BioMed Research International, 2014:8
- Kumar C., and Anand S., (1998). Significance of microbial biofilms in food industry. A review. International Journal of Food Microbiology, 42:9-27.
- Kunisaki, K.; Janoff, E. (2009). Influenza in immunosuppressed populations: A review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine response. Lancet Infectious Diseases, 9:493-504.
- Kurtzweil, P. (2012). Keeping Food Safety Surveys Honest. FDA Consumer, United States Food and Drug Administration. Available online: <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/fdsurvey.html>
- Kushwaha, K., & Muriana, P. M. (2009). Adherence characteristics of *Listeria* strains isolated from three ready-to-eat meat processing plants. Journal of Food Protection, 72:2125-2131.
- Kusumaningrum, H. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. International Journal of Food Microbiology, 85:227-236.
- Kusumaningrum, H.D., van Asselt, E.D., Beumer, R.R., & Zwietering, M.H. (2004). A quantitative analysis of cross-contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. via domestic kitchen surfaces. Journal of Food Protection, 67:1892-1903.
- Lader, D. (1999). Food safety in the home 1998. Office for National Statistics, London.
- Lafuma, A., & Quéré, D. (2003). Superhydrophobic states. Nature Materials, 2:457-60.
- Larson E. (1988) A causal link between handwashing and risk of infection? Examination of the evidence. Infection Control and Hospital Epidemiology, 9:28-36.
- Larson, E.L., & Aiello, A.E.I. (2001). Hygiene and health: an epidemiologic link? American Journal of Infection Control, 29:232-238.
- Lazazzera, B.A. (2005). Lessons from DNA microarray analysis: The gene expression profile of biofilms. Current Opinion in Microbiology, 8:222-227.
- Le Guern, A.S., Martin, L., Savin, C., Carniel, E., (2016). Yersiniosis in France: overview and potential sources of infection. International Journal of Infectious Diseases, 46: 1-7.

- Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2:63-76.
- Leriche, V., Briandet, R., & Carpentier, B. (2003). Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environmental Microbiology*, 5:64-71.
- Leriche, V., & Carpentier, B. (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 88:594-605
- Leriche, V., & Carpentier, B. (1995). Viable but Nonculturable *Salmonella* Typhimurium in Single- and Binary-Species Biofilms in Response to Chlorine Treatment. *Journal of Food Protection*, 11:1183–1280.
- Leriche, V., Briandet, R., & Carpentier, B. (2003). Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environmental Microbiology*, 5:64–71.
- Leriche, V., Chassaing, D., & Carpentier, B. (1999). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology* 51:169-182.
- Levy, S.B. (2001). Antibacterial household products: Cause for concern. *Emerging Infectious Diseases*, 7:512-515.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:999-1007.
- Lianou, A. & Koutsoumanis, K.P. (2009) Evaluation of the effect of defrosting practices of ground beef on the heat tolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis., *Meat science*, 82:461–468.
- Li, G., et al. (2012). Surface contact stimulates the just-in-time deployment of bacterial adhesins. *Mol. Microbiol.* 83:41–51.
- Li-Cohen, A.E., & Bruhn, C.M. (2002). Safety of consumer handling of fresh produce from the time of purchase to the plate: a comprehensive consumer survey. *Journal of Food Protection*, 65:1287-1296.
- Lin, C., Jensen, & K., Yen, S. (2005). Awareness of foodborne pathogens among US consumers. *Food Quality and Preference*, 16:401–412.
- Lin, C.-M., Takeuchi, K., Zhang, L., Dohm, C.B., Meyer, J.D., Hall, P., & Doyle, M.P. (2006). Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69:71-79.
- Lindsay, D., & von Holy, A. (2006). What food safety professionals should know about bacterial biofilms. *British Food Journal*, 108: 27-37.
- Lipson, A. (1976) Infection dose of *Salmonella*. *Lanceti*, 969.

- Loo, C.Y., Young, P.M., Lee, W.H., Cavaliere, R., Whitchurch, C.B., & Rohanizadeh, R. (2012). Superhydrophobic, nanotextured polyvinyl chloride films for delaying *Pseudomonas aeruginosa* attachment to intubation tubes and medical plastics. *Acta Biomaterial*, 8:1881-1890.
- Lovett, J., Bradshaw, J.G., and Peeler, J.T. 1982. Thermal inactivation of *Yersinia enterocolitica* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 44:517-519.
- Luber, P., Brynestad, S., Topsch, D., Scherer, K., & Bartelt, E. (2006). Quantification of *Campylobacter* Species Cross-Contamination during Handling of Contaminated Fresh Chicken Parts in Kitchens. *Society*, 72:66-70.
- Luo, Y., Nou, X., Yang, Y., Alegre, I., Turner, E., Feng, H., Abadias, M., & Conway, W.S. (2011). Determination of free chlorine concentrations needed to prevent *Escherichia coli* O157:H7 cross-contamination during fresh-cut produce wash. *Journal of Food Protection*, 74:352-358.
- Luppens, S.B.I., Kara, D., Bandounas, L., Jonker, M.J., Wittin, F.R.A., Bruning, O., Breit, T.M., Cate, J.M., & Crielaard, W. (2008). Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus* mutants grown in a dual-species biofilm. *Oral Microbiology and Immunology*, 23:183-189.
- Lynch, M.F., Tauxe, R.V., & Hedberg, C.W. (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*, 137:307-315.
- Mackintosh, C.A., & Hoffman, P.N. (1984). An extended model for transfer of micro-organisms via the hands: differences between organisms and the effect of alcohol disinfection. *The Journal of Hygiene, Cambridge*, 92:345-355.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J., & Magny, P., (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53:742-746.
- Mah, T-F.C., & O'Toole, A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9:34-39.
- Mai, T., & Conner D. (2007). Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 120:282-286
- Maillard, J.Y. (2002) Bacterial target sites for biocide action. *Symp Ser Soc Appl Microbiol 2002*: 16S-27S.
- Maillard, J.Y. (2005) Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 1:307-320.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., et al. (2010) The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50:882-889.
- Malheiros Da Silva, P., dos Passos, C.T., Casarin, L.S., Serraglio, L., & Tondo, E.C. (2010). Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control*, 21:298-301.

- Manios, S., Kapetanakou, A., Zilelidou, E., Poimenidou, S., & Skandamis, P. (2014) Mechanisms and Risks associated with Bacterial Transfer between abiotic and biotic surfaces. Microbial food safety and preservation techniques. CRC Press.
- Manios, S.G. (2012). Investigating the impact of retail and household practices on the quality and safety of ready-to-eat and ready-to-cook foods. PhD Thesis. Cranfield University.
- Mariani, C., Briandet, R., Chamba, J.-F., Notz, E., Carnet-Pantiez, A., Eyoug, R.N., & Oulahal, N. (2007). Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the French raw milk smear cheese Reblochon de Savoie. *Journal of Dairy Science*, 90:1653–1661.
- Marin, C., Hernandez, A., & Lainez, M. (2009). Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science*, 88:424–431.
- Marouani-Gadri, N., Augier, G., & Carpentier, B. (2009). Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection — Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakaï and EDL *E. coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 133:62–67.
- Marples, R.R. (1976) Local infections – experimental aspects. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 27:449–457.
- Mather, A.E., et al. (2013). Distinguishable epidemics within different hosts of the multidrug resistant zoonotic pathogen *Salmonella* Typhimurium DT 104. *Science*, 341:1514-1517.
- Mathias, K. (1999). The use of consumer knowledge, beliefs and attitudes in the development of a local authority strategy for domestic food safety education. PhD thesis. Open University, Cardiff, UK.
- Mattick, K., Durham, K., Domingue, G., Jørgensen, F., Sen, M., Schaffner, D.W., & Humphrey, T. (2003). The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. *International Journal of Food Microbiology*, 25:213-226.
- Matsukawa, M., Greenberg, E.P. (2004). Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 186:4449 –4456.
- Maurer, J., Byrd-Bredbenner, C., Wheatley, V., Cottone, E., & Clancy, M. (2008). Young adults report better handwashing behaviors than they actually practice. *Food Protection Trends*, 28:912-916.
- Mazengia, E., Fisk, C., Liao, G., Huang, H., & Meschke, J. (2015). Direct observational study of the risk of cross- contamination during raw poultry handling: practices in private homes. *Food Protection Trends*, 35:8-23.
- Mc Cay, P.H., Ocampo-Sosa, A.A., & Fleming, G.T. (2010). Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. *Microbiology*, 156:30–38.

- McArthur, L., Holbert, D., Forsythe, W. (2006). Compliance with food safety recommendations among university undergraduates: Applications of the health belief model. *Family and Consumers Sciences Research Journal*, 35:160–170.
- McCarthy, M., Brennan, M., Kelly, A. L., Ritson, C., De Boer, M., & Thompson, N. (2007). Who is at risk and what do they know? Segmenting a population on their food safety knowledge. *Food Quality and Preference*, 18:205-217.
- McCullough, N.B. & Eisele, C.W. (1951). Experimental human salmonellosis. *Journal of Infectious Diseases*, 88:278–279.
- McDonnell, G., & Russell, A.D. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:147–179.
- McEldowney, S., & Fletcher, M. (1988) Effect of temperature and humidity on survival of bacteria attached to dry solid surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 7:83-86.
- McIntosh, W.A., Christensen, L.B. & Acuff, G.R. (1994). Perceptions of risks of eating undercooked meat and willingness to change cooking practices. *Appetite*, 22:83–96.
- Medeiros, L.C., Kendall, P., Hillers, V., Chen, G., & Dimascola, S. (2001). Identification and classification of consumer food- handling behaviors for food safety education. *Journal of the American Dietetic Association*, 101, 1326–1339.
- Meer, R.R., & Misner, S.L. (2000). Food safety knowledge and behavior of expanded food and nutrition education program participants in Arizona. *Journal of Food Protection*, 63: 1725-1731.
- Mei, G.F., Hua, M.S., & Yong, T. (2007). Empirical Study on the Influence between Logistics Information Capabilities and Supply Chain Performance. *Industrial Engineering and Management*, 12-18.
- Mendes, M.J. & Lynch, D.J. (1978). A bacteriological survey of kitchens. *Environmental Health*, 86:227-231.
- Merianos, J.J. (2001). Surface-Active Agents. In: Block SS, ed. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 5th ed. Philadelphia, PA 19106 USA: Lippincott Williams & Wilkins, 283–320
- Meyer, B. (2001) Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. In 2nd International Symposium on Disinfection and Hygiene: Future Prospects. pp. 249–253. Wageningen, the Netherlands: Elsevier Sci Ltd.
- Michaels, B., Gangar, V., Ayers, T., Meyers, E., & Curiale, M.S. (2001). The significance of hand drying after handwashing. In: Edwards JSA, Hewedi MM, editors. *Culinary arts and science III global and national perspectives*. Bournemouth University, UK: Worshipful company of cooks centre for culinary research at Bournemouth University p. 294-301.
- Midelet, G., & Carpentier, B. (2002). Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:4015–24.

- Midelet, G., Kobilinsky, A., & Carpentier, B. (2006). Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria monocytogenes* from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:2313-2321.
- Mittal, K. (2009). *Silanes and Other Coupling Agents*, - CRC Press Book, CRC Press Book. Available at: <https://www.crcpress.com/Silanes-and-Other-Coupling-Agents-Volume-5/Mittal/9789004165915> (Accessed: 5 May 2016).
- Montville, R., Chen, Y., & Schaffner, D.W. (2001). Glove barriers to bacterial cross-contamination between hands to food. *Journal of Food Protection*, 64:845–849.
- Montville, T.J., & Matthews, K.R. (2010). *Μικροβιολογία Τροφίμων* Εκδ. Ιων, Αθήνα.
- Montville, T.J., & Matthews, K.R. (2008). *Food microbiology: An introduction*. 2nd ed, ASM Press, Washington D.C.
- Montville, R., & Schaffner, D.W. (2003). Inoculum Size Influences Bacterial Cross Contamination between Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:7188-7193.
- Moons, P., Michiels, C.W., & Aertsen, A. (2009). Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35:157-168.
- Moore, G., Blair, I.S., & McDowell, D.A. (2007). Recovery and transfer of *Salmonella* Typhimurium from four different domestic food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 70:2273–80.
- Møretrø, T., & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: Biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1:107–121.
- Morse, D. L., Shayegani, M. & Gallo, R.J. (1984). Epidemiologic investigation of a *Yersinia* camp outbreak linked to a food handler. *American Journal of Public health*, 74:589-92.
- Mosteller, T.M., & Bishop, J.R. (1993). Sanitizer efficacy against attached bacteria in milk biofilm. *Journal of Food Protection*, 56:34–41.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., & Pfaller, M.A. (Eds.). (2007). *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed.). Washington: ASM Press.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B., & Foster, K.R. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 33:206–224.
- Nascentes N., Chiarini E., Teresa M., de Aguiar M., Augusto L., (2010). PFGE characterization and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. *Meat science*, 92:635-643.
- Nataro, J.P., & Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11:142–201.

- National Vital Statistics System, Centers for Disease Control and Prevention. National Vital Statistics Reports. Available online: http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr64/nvsr64_12.pdf (Accessed on 05/2016).
- Neal, J. A., Binkley, M., & Henroid, D. (2012). Assessing factors contributing to food safety culture in retail food establishments. *Food Protection Trends*, 32:468–476.
- Nesbitt, A., Majowics, S., Finley, R., Marshall, B., Pollari, F., Sargeant, J., Ribbel, C., Wilson, J., & Sittler, N. (2009). High-Risk food consumption and food safety practices in a Canadian community. *Journal of Food Protection*, 72:2575-2586.
- Nikolaev, Y.A., & Plakunov, V.K. (2007). Biofilm-“City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology*, 76:125-138.
- Nilsson, R., Ross, T., & Bowman, J. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150:14-24.
- Norwood, D., & Gilmour, A., (2001). The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in applied Microbiology*, 33:320-324.
- Nostro, A., Scaffaro, R., D'Arrigo, M., Botta, L., Filocamo, A., Marino, A., & Bisignano, G. (2012). Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96:1029-1038.
- Nystrom, T., (2003). Conditional senescence in bacteria: death of the immortals. *Molecular Microbiology*, 48:17-23.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005) Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113:823-839.
- Odwin, R., & Badrie, N. (2008). Consumers’ perceptions and awareness of food safety practices in Barbados and Trinidad, West Indies – a pilot study. *International Journal of Consumer Studies*, 32:394-398.
- Official Journal European Communities L139, 30/04/2004 (2004) ‘Eur Parl Regulation 852/2004’, *Official Journal of the European Union*, 47:1-54.
- Official Journal European Communities L338/1, 22/12/2005 (2005) ‘Eur Parl Regulation 2073/2005’, *Official Journal of the European Union*, 48:1-26.
- Ojima, M., Toshima, Y., Koya, E., Ara, K., Tokuda, H., Kawai, S., Kasuga, F., & Ueda, N. (2002). Hygiene measures considering actual distributions of microorganisms in Japanese households. *Journal of Applied Microbiology*, 93:800-809.
- Orgaz, B., Lobete, M.M., Puga, C.H., & Jose, C.S. (2011). Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 12:817-828.

- Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34:577-588.
- Pan, Y., Breidt, F., & Kathariou, S. (2009). Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 5846-5852.
- Papadopoulou, O., Chorianopoulos, N.G., Gkana, E.N., Grounta, A.V., Koutsoumanis, K.P., & Nychas, G.-J.E. (2012). Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. *Meat Science*, 90
- Parsek, M.R., and P.K. Singh. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 57:677-701.
- Patrick, D.R., Findon, G. & Miller, T.E. (1997). Residual moisture determines the level of touch-associated bacterial transfer following hand washing. *Epidemiology and Infection*, 119:319-325.
- Patterson, M.F., Linton, M., & Doona, C.J. (2007). Introduction to high pressure processing of foods. In: Doona, C.J., Freeherry, F.E. (Eds.), high pressure processing of foods. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, pp. 1-14.
- Pennington, H. (2010). *Escherichia coli* O157. *Lancet*, 376: 1428-1435.
- Pereni, C.I., Zhao, Q., Liu, Y., & Abel, E. (2006). Surface free energy effect on bacterial retention. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 48:143-147.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Todd, E., Carrasco, E., Garciagimeno, R., & Zurera, G. (2007). Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product. *Meat Science*, 76:692-699.
- Perez-Rodriguez, F., Valero, A., Carrasco, E., Garcia, R.M., & Zurera, G. (2008). Understanding and modeling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19:131-144.
- Petit, F. & Lowbury, E.J.L. (1968). Survival of wound pathogens under different environmental conditions. *Journal of Hygiene, Cambridge*, 66:393-406.
- Petrova, O.E., & Sauer, K. (2012) Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of Bacteriology*, 194:2413-25.
- Phang, S. H., & Bruhn, C. M. (2011). Burger Preparation: What consumers say and do in the home. *Journal of Food Protection*, 74:1708-1716.
- Pinchuk, I.V., Beswick, E.J., & Reyes, V.E. (2010). Staphylococcal enterotoxins. *Toxins* 2:2177–2197.
- Poimenidou, S., Belessi, C., Giaouris, E., et al., (2009). *Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment. *Applied and environmental Microbiology*, 75:7182-7188.

- Poulsen, L. (1999). Review: Article microbial biofilm in food processing. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 32:321-326.
- Pratt, L.A., Kolter, R., (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:598 –603.
- Prigent-Comparet, C., Vidal, O., Dorel, C., Hooreman, M., & Lejeune P. (1999). Abiotic surface sensing and biofilm dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 181:5993- 6002.
- Privett, B.J., Youn, J., Hong, S.A., Lee, J., Han, J., Shin, J.H., & Schoenfisch, M.H. (2011). Antibacterial fluorinated silica colloid superhydrophobic surfaces. *Langmuir*: The ACS Journal of Surfaces and Colloids, 27:9597-9601.
- Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.-C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor, Hidayah, M.S., Ubong, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K., & Son, R. (2011). Review Article *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18:465-473.
- Qin, Z., Yang, L., Qu, D., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 155:2148-2156.
- Raczowska, A., Skorek, K., Brzóstkowska, M., Lasińska, A., & Brzostek, K. (2011). Pleiotropic effects of a *Yersinia enterocolitica* ompR mutation on adherent-invasive abilities and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 32:43–49.
- Raj, H.D., & Bergdoll, M.S. (1969) Effect of enterotoxin B on human volunteers. *Journal of Bacteriology*, 98:833–834.
- Raloff, J. (1996). Sponges and sinks and rags, oh my! Where microbes lurk and how to rout them. *Science News*, 172–174.
- Rangel, J., Sparling, P., Crowe, C., Griffin, P., & Swerdlow, D. (2005). Epidemiology of *E. coli* O157:H7 Outbreaks United States 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 11.
- Rao, D., Webb, J.S., Kjelleberg, S. (2005). Competitive interactions in mixed- species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:1729–1736
- Rathmachers, B. & Borneff, M. (1977). Development of a new test method for surface disinfection procedures IV: natural drying rates of microorganisms and their modification by environmental factors. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene I Abteilung Originale, Reihe B* 165:43–59.
- 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.
- Rayner, J., Veeh, R., Flood, J. (2004). Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 95:29–39.

- Redmond, E.C. (2002). Food handling risks in the home: development, application and evaluation of a social marketing food safety education initiative. Ph.D. thesis. University of Wales, Cardiff, UK.
- Redmond, E.C., & Griffith, C.J. (2003). Consumer food handling in the home: a review of food safety studies. *Journal of Food Protection*, 66:130-161.
- Redmond, E., Griffith, C., Slader, J., & Humphrey, T.J. (2004). Microbiological and observational analysis of cross contamination risks during domestic food preparation. *British Food Journal*, 106:581-597.
- Redmond, E., & Griffith, P. (2009). The importance of hygiene in the domestic kitchen: Implications for preparation and storage of food and infant formula. *Perspectives in Public Health*, 129:69-76.
- Reid, G., Lam, D., Policova, Z., & Neumann, A.W. (1993). Adhesion of two uropathogens to silicone and lubricious catheters: influence of pH, urea and creatinine. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 4:17-22.
- Reisner, A., Holler, B.M., Molin, S., Zechner, E.L. (2006). Synergistic effects in mixed *Escherichia coli* biofilms: conjugative plasmid transfer drives biofilm expansion. *Journal of Bacteriology*, 188:3582-3588.
- Remis, J.P., Costerton, J.W., & Auer, M. (2010). Biofilms: Structures that may facilitate cell-cell interactions. *The ISME Journal*, 4:1085-1087.
- Rendueles, O., & Ghigo, J. M. (2012). Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36972-989.
- Renier, S., Hébraud, M., & Desvaux, M. (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: An additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environmental Microbiology*, 13:835-850.
- Rieu, A., Lemaître, J.P., Guzzo, J., & Piveteau, P. (2008). Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 126:76-82.
- Robert, J.M.I., Toguchi, A., & Harshey, R.M. (2001). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Swarming Mutants with Altered Biofilm-Forming Abilities: Surfactin Inhibits Biofilm Formation. *Bio. Journal of Bacteriology*, 83:5848-5854.
- Roberts, D. (1982). Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970-1979. *Journal of Hygiene, Cambridge*, 89:491-498.
- Roberts, D. (1986). Factors contributing to outbreaks of foodborne infection and intoxication in England and Wales 1970-1982. In *Proceedings of the World Congress of Foodborne Infections and Intoxications 1*. pp. 157-159. Berlin: Institute of Veterinary Medicine.
- Roberts, D. (1990). Foodborne illness; sources of infection: food. *Lancet* 336, i, 859-861.

- Rode, T.M., Langsrud, S., Holck, A., & Møretrø, T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 116:372–383.
- Rodriguez, A., Autio, W.R., & McLandsborough, L.A. (2008). Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation. *Journal of Food Protection*, 71:170–175.
- Rodríguez, A., Autio, W.R., & McLandsborough, L.A., (2007). Effects of Inoculation Level, Material Hydration, and Stainless Steel Surface Roughness on the Transfer of *Listeria monocytogenes* from Inoculated Bologna to Stainless Steel and High-Density Polyethylene. *Journal of Food Protection*, 70:1423–1428.
- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D., & Normark, S. (1998). Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *Journal of Bacteriology*, 180:722–731.
- Rossi, E., Scapin, D., & Tondo, E. (2013). Survival and transfer of microorganisms from kitchen sponges to surfaces of stainless steel and polyethylene. *The Journal of Infection in Developing Countries*.
- Rossoni, E.M., & Gaylarde, C.C. (2000) Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 61:81–85.
- Rusin, P., Orosz-Coughlin, P., & Gerba, C. (1998). Reduction of faecal coliform, coliform and heterotrophic plate count bacteria in the household kitchen and bathroom by disinfection with hypochlorite cleaners. *Journal of Applied Bacteriology*, 85:819–828.
- Ryan, K.J., & Ray, C.G. (Eds.). (2004). *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Disease*. (Fourth Edition. ed.). New York.: McGraw-Hill.
- Saá, Ibusquiza, P.S., Herrera, J.J.R., Vázquez-Sánchez, D., & Cabo, M.L. (2012). Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. *Food Control*, 25:202–210.
- Saá, Ibusquiza, P.S., Herrera, J.J.R., & Cabo, M.L. (2011). Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 28:418–425.
- Sanchez-Vizueté, P., Le Coq, D., Bridier, A., Herry, J.-M., Aymerich, S., & Briandet, R. (2015). Identification of ypqP as a new *Bacillus subtilis* biofilm determinant that mediates the protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial agents in mixed-species communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 81:109–118.
- Sanders, S.Q., Boothe, D.H., Frank, J.F., & Arnold, J.W. (2007). Culture and detection of *Campylobacter jejuni* within mixed microbial populations of biofilms on stainless steel. *Journal of Food Protection*, 70:1379–1385.
- Sattar, S.A., Springthorpe, S., Mani, S., Gallant, M., Nair, R.C., & Scott, E. (2001). Transfer of bacteria from fabrics to hands and other fabrics: development and application of a quantitative

- method using *Staphylococcus aureus* as a model. *Journal of Applied Microbiology*, 90:962–970.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184:1140–1154.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States - Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17:7–11.
- Schantz, P.M. (1983). Trichinosis in the United States: 1947-1981, in: *Control of Trichinella Spiralis in Meat*, Las Vegas, Nev. (USA), 22-25 Jun 1982.
- Scharff, R. (2012). Economic Burden from Health Losses Due to Foodborne Illness in the United States. *Journal of Food Protection* 75: 123-31.
- Schonewille, E., Nesse, L.L., Hauck, R., Windhorst, D., Hafez, H.M., & Vestby, L.K. (2012). Biofilm building capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 65:360–365.
- Schulte, S., Wingender, J., & Flemming, H-C. (2005). Efficacy of biocides against biofilms. In: Paulus w (ed) *Directory of microbicides for the protection of materials*. Springer, Berlin, pp 93–120.
- Schwering, M., Song, J., Louie, M., Turner, R.J., & Ceri, H. (2013). Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. *Biofouling*, 29:917–928.
- Scott, E.A. (2003). Food safety and food-borne disease in 21st century homes. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 14:277–280.
- Scott, E.A., & Herbold, N. (2010). An in-home video study and questionnaire questionnaires of food preparation, kitchen sanitation, and hand washing practices. *Journal of Environmental Health*, 72:8–13.
- Scott, E.A. (1990). The survival and transfer of potentially pathogenic bacteria from environmental sites and surfaces. PhD Thesis, University of London.
- Scott, E.A., & Bloomfield, S.F. (1985). A bacteriological investigation to assess the effectiveness of a continuous release disinfectant for toilet hygiene. *Journal of Applied Bacteriology* 59, kitchens. *Environmental Health*, 86:227–231.
- Scott, E.A., & Bloomfield, S.F. (1990a). Survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. *Journal of Applied Bacteriology*, 68:271–278.
- Scott, E.A. & Bloomfield, S.F. (1990b). Investigation of the effectiveness of detergent washing, drying and chemical disinfection on contamination of cleaning cloths. *Journal of Applied Bacteriology*, 68:279–283.

- Scott, E.A. & Bloomfield, S.F. (1993). An in-use study of the relationship between bacterial contamination of food preparation surfaces and cleaning cloths. *Letters in Applied Microbiology*, 16:173–177.
- Scott, E.A., Bloomfield, S.F. & Barlow, C.G. (1982). An investigation of microbial contamination in the domestic environment. *Journal of Hygiene, Cambridge*, 89:279–293.
- Scott, E.A., Bloomfield, S.F. & Barlow, C.G. (1984). Evaluation of disinfectants in the domestic environment under ‘in use’ conditions. *Journal of Hygiene, Cambridge*, 92:193–203.
- Seo, K.S., & Bohach, G.A. (2007). *Staphylococcus aureus*. Ch 22 In: Doyle MP, Beuchat LR (eds) *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. 3rd ed, ASM Press, Washington D.C., p. 493–518.
- Sharma, S. (1996). *Applied Multivariate Techniques*, Willey, New York.
- Shayegani, M., Morse, D., DeForge, I., Root, T., Parsons, L.M., & Maupin, P.S. (1983). Microbiology of a major foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Yersinia enterocolitica* serogroup O:8. *Journal of Clinical Microbiology*, 17:35–40.
- Sheen, S. (2008). Modeling Surface Transfer of *Listeria monocytogenes* on Salami during Slicing. *Journal of Food Science*, 73: E304–E311.
- 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.
- Sheen, S., Costa, S., & Cooke, P. (2010). Impact of mechanical shear on the survival of *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Science*, 75:E387-93.
- Shi X., & Zhu X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20:407-413
- Silagyi, K., Kim, S.H., Lo, Y.M., & Wei, C.I. (2009). Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. *Food Microbiology*, 26:514-519.
- Silva S., Teixeira P., Oliviera R., & Azeredo J. (2008). Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 71:1379-1385.
- Simões, M., Simões, L.C., Pereira, M.O., & Vieira, M.J. (2008). Antagonism between *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* in planktonic systems and in biofilms. *Biofouling*, 24:339-349.
- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J. (2008). Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses. *International Journal of Food Microbiology*, 128:309–316.
- Simões, M., Simões, L.L.C., Machado, I., Pereira, M.O., & Vieira, M.J. (2006). Control of flow-generated biofilms using surfactants - evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing*, 84:338–345.

- Simões, M., Simões, L., & Vieira, M. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology*, 43:573–583.
- Simões, C.,L., Simões, M., & JoãoVieira, M. (2010). Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:6673–6679.
- Simões, L.C., Azevedo, N., Pacheco, A., Keevil, C.W., Vieira, M.J. (2006). Drinking water biofilm assessment of total and culturable bacteria under different operating conditions. *Biofouling*, 22:91–99.
- Simões, L.C., Lemos, M., Pereira, A.M., Abreu, A.C., Saavedra, M.J., Simões, M. (2011). Persister cells in a biofilm treated with a biocide. *Biofouling*, 27:403–411.
- Simões, M., Simões, L. C., and Vieira, M. J. (2009). Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Research*, 43:229–237.
- Simões, M., Simões, L.C., Pereira, M.O., Vieira, M.J. (2008). Antagonism between *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* in planktonic systems and in biofilms. *Biofouling*, 24:339-349.
- Simon, S.S., & Sanjeev, S. (2007). Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control*, 18:1565–1568.
- 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.
- Soares, V.M., Pereira, J.G., Viana, C., Izidoro, T.B., Bersot, L. dos S., & Pinto, J.P. (2012). Transfer of *Salmonella* Enteritidis to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. *Food Microbiology*, 30:453–456.
- Sofos, J. N., & Geornaras, I. (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157: H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86:2–14.
- Solano, C., Garcia B., Valle J., Berasain C., Ghigo JM., Gamazo C., & Lasa I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43:793-808.
- Solomon, E.B., Niemira, B.A., Sapers, G.M., & Annous, B.A. (2005). Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *Journal of Food Protection*, 68:906–912.
- Song, J., Kong, H., & Jang, J. (2011). Bacterial adhesion inhibition of the quaternary ammonium functionalized silica nanoparticles. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 82:651–956. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.027>.
- Speranza B., Corbo M., & Sinigaglia M., (2011). Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* spp. biofilm formation. *Journal of Food Science* 76:M12-M16.

- Splendiani, A., Livingston, A.G., & Nicoletta, C. (2006). Control membrane-attached biofilms using surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*, 94:15–23.
- Stepanovic S., Cirkovic I., Mijac V., & Svabic-Vlahovic M. (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, 20:339-343.
- Stepanović, S., Cirković, I., Ranin, L., Svabić-Vlahović, M., Svabic, M., & Stepanovic, S. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38:428–432.
- Stewart, C.M. (2003). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. Ch 12 In: Hocking AD (ed) *Foodborne microorganisms of public health significance*. 6th ed, Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch), Sydney, 359–380.
- Stewart, P.S., & Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358:135-138.
- Stone, L.S., & Zottola, E.A. (1985). Relationship between the growth phase of *Pseudomonas fragi* and its attachment to stainless steel. *Journal of Food Science*, 50:957-960.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., & Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56:187-209.
- Stopforth, J.D., Samelis, J., Sofos, J.N., Kendall, P.A., & Smith, G.C. (2002). Biofilm formation by acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. *Journal of Food Protection*, 65:1717-1727.
- Stopforth, J.D., Skandamis, P.N., Ashton, L.V., Geornaras, I., Kendall, P.A., Belk, K.E., Scanga, J. A., Smith, G.C., & Sofos, J.N. (2006). Impact of inoculum preparation and storage conditions on the response of *Escherichia coli* O157:H7 populations to undercooking and simulated exposure to gastric fluid. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:672-679.
- Surujlal, M. & Badrie, N. (2003). Household consumer food safety study in Trinidad, West Indies. *Internet Journal of Food Safety*, 3:8-14.
- Tacket, C.O., Ballard, J., Harris, N., Allard, J., Nolan, C., Quan, T. and Cohen, M.L. (1985). An outbreak of *Yersinia enterocolitica* infections caused by contaminated tofu (soybean curd). *American Journal of Epidemiology*, 121:705-711.
- Tacket, C.O., Narain, J.P., Sattin, R., Lofgren, J.P., Konigsberg, C., Jr., Rendtorff, R.C., Rausa, A., Davis, B.R. & Cohen, M.L. (1984). A multistate outbreak of infections caused by *Yersinia enterocolitica* transmitted by pasteurized milk. *Jama*, 251:483-6.
- Tang, P., Zhang, W., Wang, Y., Zhang, B., Wang, H., Line, C., & Zhang L. (2011) Effect of superhydrophobic surface of titanium on *Staphylococcus aureus* adhesion. *Journal of nanomaterials*, 2011:178921
- Tait, K., & Sutherland, I.W. 2002. Antagonistic interactions amongst bacteriocin- producing enteric bacteria in dual species biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 93:345–352

- Takahashi, H., Suda, T., Tanaka, Y., & Kimura, B. (2010). Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology*, 50:618–625.
- Talan, D.A., Staatz, D., Staatz, A., Goldstein, E.J.C., Singer, K., & Overturf, G.D. (1989). *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted human wound infections: Laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. *Journal of Clinical Microbiology* 27:78–81.
- Talarico, F., Rocchia, E., & Nero, I.D. (1997). Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus* in food-handlers in the province of Catanzaro (Italy). *Igiene Moderna* 107:137–142.
- Tang, L., Pillai, S., Revsbech, N.P., Schramm, A., Bischoff, C., & Meyer, R.L. (2011). Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. *Biofouling*, 27:111–121.
- Teare L. (1999). Handwashing—a modes measure—with big effects. *British Medical Journal*, 318:686.
- Tebutt, G.M. (1986). An evaluation of various working practices in shops selling raw and cooked meats. *Journal of Hygiene, Cambridge*, 97:81–90.
- Teixeira, P. & Oliveira, R. (1999). Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 13:1287
- Teixeira, P., Silva, S. C., Araújo, F., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2007). Bacterial adhesion to food contacting surfaces: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.
- Thames, S.F., & Panjnani, K.G., (1996). Organosilane polymer chemistry: A review. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers*, 6:59-94.
- Thompson, J.S. & Gravel, M.J. (1986). Family outbreak of gastroenteritis due to *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3 from well water. *Canadian Journal of Microbiology*, 32:700-701.
- Thormar, H., & Hilmarsson, H. (2010) Killing of *Campylobacter* on contaminated plastic and wooden cutting boards by glycerol monocaprinate (monocaprin) *Letters in Applied Microbiology*, 51:319-324.
- Threlfall, J. (2000). Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104 – a truly international multiresistant clone; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 7-10.
- Timm, N. (2002). *Applied Multivariate Analysis*, Springer- Verlag, New York.
- Tolker-Nielsen, T., & Molin, S. (2000). Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology*, 40:75–84.
- Toutain, C.M., Caizza, N.C., Zegans, M.E., O’Toole, G.A. (2007). Roles for flagellar stators in biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Res. Microbiol.* 158:471–477.

- Trachoo, N. & Frank, J.F. (2002) Effectiveness of chemical sanitizers against *Campylobacter jejuni*-containing biofilms. *Journal of Food Protection*, 65:1117–1121.
- Trepka, M.J., Newman, F.L., Dixon, Z., & Huffman, F.G. (2007). Food safety practices among pregnant women and mothers in the women, infants, and children program, Miami, Florida. *Journal of Food Protection*, 70:1230–1237.
- Turnbull, D. (1981). Metastable structures in metallurgy. *Metallurgical and Materials Transactions B*, 12:217-230
- Uhlich, G.A., Rogers, D.P., & Mosier, D.A. (2010). *Escherichia coli* serotype O157:H7 retention on solid surfaces and peroxide resistance is enhanced by dual-strain biofilm formation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7:935–943.
- United States Food and Drug Administration. 2006. FSIS Food Safety Survey Topline Frequency Report. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/ConsumerBehaviorResearch/ucm080374.htm#sech>.
- Unusan, N. (2007). Consumer food safety knowledge and practices in the home in Turkey. *Food Control*, 18:45-51.
- US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, USDA- FSFIS (2010). Ground beef and food safety. Available at: http://www.fsis.usda.gov/fact_sheets/Big_Thaw/index.asp, (Accessed on 11/2012).
- US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, USDA- FSFIS (2012). Leftovers and food safety. Available at: http://www.fsis.usda.gov/Fact_Sheets/Leftovers_and_Food_Safety/index.asp. (Accessed on 11/2012).
- U.S. Census Bureau. State & County QuickFacts. Available online: <http://quickfacts.census.gov/qfd/states/00000.html> (Accessed on 05/2016).
- van Asselt, E.D., de Jong, A.E., de Jonge, R., & Nauta, M.J. (2008). Cross-contamination in the kitchen: Estimation of transfer rates for cutting boards, hands and knives. *Journal of Applied Microbiology*, 105:1392–1401.
- van der Veen, S., & Abee, T. (2011). Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 144:421–431.
- van Houdt R., & Michiels A., (2010). Biofilm formation and the food industry- A focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109:117-1131.
- van Houdt, R., & Michiels, C.W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156:626–633.
- van Kleef, E., Houghton, J.R., Krystallis, A., Pfenning U., Rowe, G., van Dijk, H., van der Lans I.A., & Frewer L.J. (2007). Consumer evaluations of food risk management quality in Europe. *Risk Analysis* 27,1565-1580

- van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., & Zehnder, A.J. (1987). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:1898–1901.
- Van Schothorst, M., Huisman, J., & Van Os, M. (1978). *Salmonella*-onderzoek in huishoudens met salmonellose bij zuigen. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 12:1121–1124.
- Van Selm, M., & Jankowski, N.W., (2006). Conducting Online Surveys, *Quality & Quantity*, 40:435-456
- Vellusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., & Adley, C. (2010). Overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 28:232-254.
- Verran, J., & Whitehead, K. (2005). Factors affecting microbial adhesion to stainless steel and other materials used in medical devices. *International Journal of Artificial Organs*, 28:1138–1145.
- Vonberg, R.P., & Gastmeier, P. (2007). Hospital-acquired infections related to contaminated substances. *The Journal of Hospital Infection*, 65:15-23.
- Vorst, K.L., Todd, E.C.D., & Rysert, E.T. (2006). Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. *Journal of Food Protection*, 69:619–626.
- 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. *Journal of Food Protection*, 66:1176–83.
- Wang, R., Kalchayanand, N., Schmidt, J.W., & Harhay, D.M. (2013). Mixed biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium enhanced bacterial resistance to sanitization due to extracellular polymeric substances. *Journal of Food Protection*, 76:1513–22.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295:1487.
- WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses. (2000). WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe: Spain. Seventh Report 1993–1998.
- Wilks, S., Michels, H.T. & Keevil, C.W. (2006). Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 111:93–8.
- Wingender, J., Neu, T.R., Flemming (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances? In: Wingender J., Neu T.R., Flemming (Eds). *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Springer, pp.I-19.
- Wixtrom, R.N, Stutman R.L., Burke, R.M., Mahoney A.M., Codner, M.A. (2012). Risk of Breast Implant Bacterial Contamination From Endogenous Breast Flora, Prevention With Nipple Shields, and Implications for Biofilm Formation. *Aesthetic Surgey Journal*, 32:956-963.

- Worsfold, D., & Griffin, P. (1997). Food safety behavior in the home. *British Food Journal*, 99:97–104.
- Xu, Y., Huang, G., & He, Y. (2005). Sol-gel preparation of Ba₆–3xSm₈+2xTi₁₈O₅₄ microwave dielectric ceramics. *Ceramics International*, 3:21–25.
- Yang, S., Leff, M.G., McTague, D., Horvath, K.A., Jackson-Thompson, J., Murayi, T., et al. (1998). Multistate surveillance for food-handling, preparation, and consumption behaviors associated with foodborne diseases: 1995 and 1996 BRFSS food-safety questions. *MMWR CDC Surveill Summ.* 47:33–57.
- Yap, B., Zilm, P.S., Briggs, N., Rogers, A.H., & Cathro, P.C. (2014). The effect of sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* when grown on dentine as a single- and multi-species biofilm. *Australian Endodontic Journal*, 40:101–110.
- Yoon, Y., & Sofos, J. N. (2008). Autoinducer-2 activity of Gram-negative foodborne pathogenic bacteria and its influence on biofilm formation. *Journal of Food Science*, 73:M140–M147.
- Zhang, Y., Lando, A., Estrin, A., & Levy, A. (2010). Comparisons of food safety practices between U.S. and Costa Rica. US Department of Agriculture Food Safety Education Conference, Atlanta, GA, Mar. 23-26, Retrieved from http://www.fsis.usda.gov/News_&_Events/2010_FSE_Conference_Presentations/index.asp.
- Zhao, P., Zhao, T., Doyle, M. P., Rubino, J. R., & Meng, J. (1998). Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. *Journal of Food Protection*, 61: 960–963.
- Zhao, T., Doyle, M.P., & Zhao, P. (2004). Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive – exclusion microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:3996-4003.
- Zijngel, V., van Leeuwen, M.B.M., Degener, J.E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmur, R., Harmsen, H.J.M. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*, 5:e9321.
- Zilelidou, E.A., Tsourou, V., Poimenidou, S., Loukou, A., & Skandamis, P.N. (2015). Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during preparation of fresh-cut salads: impact of cutting and shredding practices. *Food Microbiology*, 45:254–265.
- Zottola, E., & Sasahara, K. (1994) Microbial biofilms in the food processing industry-Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, 23:125-148.
- Αγγελίδης, Α., (2016) Επιδημιολογία της λιστερίωσης στην Ελλάδα. Ενημερωτικό δελτίο ΚΕΕΛΠΝΟ.
- Βαβούλα, Κ., (2015). Έλεγχος επικράτησης (επιβίωσης) στελεχών *S. enterica*, *L.monocytogenes* και *S. aureus* τεχνητά ενοφθαλμισμένων σε γάλα το οποίο αφέθηκε να ζυμωθεί προς κεφίρ και ακολούθως διατήρηθηκε υπό θερμοκρασία ψύξης. Πανεπιστήμιο Αιγαίου (Πτυχιακή Μελέτη).

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, ΚΕΕΛΠΝΟ (2014a). Επιδημιολογικά δεδομένα της λοίμωξης για τη σαλμονέλλωση (μη τύφο – παρατυφική) στην Ελλάδα 2004-2013 (Σύστημα Υποχρεωτικής δήλωσης).

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, ΚΕΕΛΠΝΟ (2014b). Επιδημιολογικά δεδομένα της λοίμωξης για τη λιστερίωση στην Ελλάδα 2004-2013 (Σύστημα Υποχρεωτικής δήλωσης).

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, ΚΕΕΛΠΝΟ (2014c). Επιδημιολογικά δεδομένα της λοίμωξης από εντεροαιμορραγικό κολοβακτηρίδιο (EHEC) στην Ελλάδα 2004-2013 (Σύστημα Υποχρεωτικής δήλωσης).

Κωνσταντινίδης, Χ., & Φέσκου, Ε. (2011). Βιομεμβράνη - κλινική σημασία στις λοιμώξεις του ουρογεννητικού συστήματος. *Ελληνική Ουρολογία* 23 (3).

Λιναρδής, Α., Παπαγιανόπουλος, Κ., & Καλησπεράτη, Ε., (2011). Η διαδικτυακή έρευνα. Πλεονεκτήματα, μειονεκτήματα και εργαλεία διεξαγωγής διαδικτυακών ερευνών. Εθνικό Κέντρο Κοινωνικών.

Παράρτημα Α

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1. Τροφιμογενή παθογόνα υπεύθυνα για το 95 % των περιστατικών τροφιμογενών νοσημάτων και το οικονομικό κόστος σε δολάρια ανά έτος για το 2011 σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών των Η.Π.Α. (Hoffmann & Anekwe, 2013)	2
Εικόνα 2. Κύκλος ζωής του βιοϋμενίου με τα στάδια προσκόλλησης, σχηματισμού ώριμου βιοϋμενίου και διασποράς των κυττάρων του από τα εξωτερικά στρώματα (Wixtrom et al., 2012)	32
Εικόνα 3. Επισκόπηση των γεγονότων και των παραγόντων που επιδρούν στην αντιστρεπτή και μη προσκόλληση των κυττάρων στις επιφάνειες (Petrova & Sauer, 2012)	34
Εικόνα 4. Θήκες plugs τοποθετημένες σε γυάλινη επιφάνεια (αναπαραγωγή μετά από άδεια από Βαβούλα, 2015)	56
Εικόνα 5. Τεμαχισμένη πλάκα αγαρόζης (1-2 mm) τοποθετημένη σε καλυπτρίδα (Βαβούλα, 2015)	57
Εικόνα 6. Τεμαχισμένες στο 1/5 plugs τοποθετημένες πάνω στην ειδική χτένα της φόρμας του gel (Βαβούλα, 2015)	57
Εικόνα 7. Τεμαχισμένες μπάντες που ήταν τοποθετημένες στην ειδική 'χτένα' της φόρμας της πήκτης και εμβαπτίστηκαν στην πηκτή της αγαρόζης (Βαβούλα, 2015)	58
Εικόνα 8. Ανάπτυξη βιοϋμενίου μικροοργανισμών σε βοθρία πολυστυρενίου σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptic Soya Broth	59
Εικόνα 9. Χρώση βιοϋμενικών κυττάρων με 1 % διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους σε βοθρία πολυστυρενίου	60
Εικόνα 10. Επαναδιαλυτοποίηση του κρυσταλλικού ιώδους που απορροφήθηκε από τα βιοϋμενικά κύτταρα με 95 % αιθανόλη.	60
Εικόνα 11. Στάδιο προσκόλλησης βακτηρίων σε γυάλινες επιφάνειες σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ¼ Ringer	61
Εικόνα 12. Τοποθέτηση κουπονιού ανοξειδωτού χάλυβα σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soya Broth για την ανάπτυξη του βιοϋμενίου	62
Εικόνα 13. Στροβιλισμός κουπονιού ανοξειδωτού χάλυβα με 10 σφαιρίδια για την αποκόλληση των βιοϋμενικών κυττάρων και τη μεταφορά τους στο υγρό διάλυμα (¼ Ringer)	62
Εικόνα 14. Βιοϋμένιο <i>S. Typhimurium</i> (κόκκινα) σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα μετά τη χρώση με πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης (400 X αριστερή εικόνα) (1000 X δεξιά εικόνα). Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η ανάγλυφη υφή του ανοξειδωτού χάλυβα.	63
Εικόνα 15. Πειραματικός σχεδιασμός 1 ^{ου} πειράματος	111
Εικόνα 16. Πειραματικός σχεδιασμός 2 ^{ου} πειράματος	130
Εικόνα 17. Πειραματικός σχεδιασμός 3 ^{ου} πειράματος	144
Εικόνα 18. Πειραματικός σχεδιασμός 4 ^{ου} πειράματος	162
Εικόνα 19. Βιοϋμένιο της <i>S. Typhimurium</i> σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα ύστερα από επώαση στους 37 °C για 72 h μετά από χρώση με ακριδίνη	167

Εικόνα 20. Βιοϋμένιο της <i>L. monocytogenes</i> σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα ύστερα από επώαση στους 37 °C για 72 h μετά από χρώση με ακριδίνη	167
Εικόνα 21. Βιοϋμένιο του <i>S. aureus</i> σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα ύστερα από επώαση στους 37 °C για 72 h μετά από χρώση με ακριδίνη	167
Εικόνα 22. Βιοϋμένιο της <i>Y. enterocolitica</i> σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα ύστερα από επώαση στους 37 °C για 72 h μετά από χρώση με ακριδίνη	168
Εικόνα 23. Βιοϋμένιο της <i>E. coli</i> O157:H7 σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα ύστερα από επώαση στους 37 °C για 72 h μετά από χρώση με ακριδίνη	168

Ευρετήριο διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Απαντήσεις στην ερώτηση 1 «Ποιο είναι το φύλο σας;»	79
Διάγραμμα 2. Απαντήσεις στην ερώτηση 2 «Ποια είναι η ηλικία σας;»	79
Διάγραμμα 3. Απαντήσεις στην ερώτηση 3 «Ποιο είναι το μορφωτικό σας επίπεδο (βαθμίδα εκπαίδευσης που έχετε ολοκληρώσει);»	80
Διάγραμμα 4. Απαντήσεις στην ερώτηση 4 «Ποια είναι η επαγγελματική σας κατάσταση;»	80
Διάγραμμα 5. Απαντήσεις στην ερώτηση 5 «Υπάρχουν παιδιά στην οικογένεια κάτω των 5 ετών;»	81
Διάγραμμα 6. Απαντήσεις στην ερώτηση 6 «Υπάρχουν ηλικιωμένοι στην οικογένεια άνω των 60 ετών;»	82
Διάγραμμα 7. Απαντήσεις στην ερώτηση 7 «Υπάρχουν έγκυες στην οικογένεια;»	82
Διάγραμμα 8. Απαντήσεις στην ερώτηση 8 «Είχατε περίπτωση τροφικής λοίμωξης τους τελευταίους 12 μήνες;»	83
Διάγραμμα 9. Απαντήσεις στην ερώτηση 9 «Τι τρόφιμο νομίζετε ότι ευθύνεται για την τελευταία τροφική λοίμωξη που είχατε;»	84
Διάγραμμα 10. Απαντήσεις στην ερώτηση 10 «Τι κάνατε στην τελευταία περίπτωση τροφικής λοίμωξης (πολλαπλής επιλογής);»	85
Διάγραμμα 11. Απαντήσεις στην ερώτηση 11 «Ποιο/ποια από τα παρακάτω βακτήρια που προκαλούν τροφικές λοιμώξεις γνωρίζετε (πολλαπλής επιλογής);»	87
Διάγραμμα 12. Απάντησεις στον ισχυρισμό 12 «Όλα τα βακτήρια που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι επικίνδυνα για τον άνθρωπο.»	87
Διάγραμμα 13. Απαντήσεις στο ισχυρισμό 13 «Η κατάψυξη σκοτώνει όλα τα βακτήρια που μπορεί να προκαλέσουν τροφική λοίμωξη.»	88
Διάγραμμα 14. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 14 «Μπορείτε να πείτε με ασφάλεια αν ένα τρόφιμο δεν είναι ασφαλές από την εμφάνιση του.»	89
Διάγραμμα 15. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 15 «Μπορείτε να πείτε με ασφάλεια αν ένα τρόφιμο δεν είναι ασφαλές από την οσμή του.»	89
Διάγραμμα 16. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 16 «Οι πάγκοι κοπής δεν θα πρέπει να είναι ξύλινοι.»	90
Διάγραμμα 17. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 17 «Είναι επικίνδυνο να χρησιμοποιούμε πάγκο κοπής που φέρει αμυχές.»	91

Διάγραμμα 18. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 18 «Οι πετσέτες-πανάκια της κουζίνας μπορεί να έχουν επικίνδυνα βακτήρια.»	92
Διάγραμμα 19. Απαντήσεις στο ισχυρισμό 19 «Το μαγειρεμένο φαγητό θα πρέπει να τοποθετείται στο ψυγείο σε 2 h.»	93
Διάγραμμα 20. Απαντήσεις στον ισχυρισμό 20 «Δεν είναι ασφαλές το φαγητό που περισσεύει να μείνει στον πάγκο για μερικές ώρες.»	93
Διάγραμμα 21. Απαντήσεις στο ερώτημα 23 «Χρησιμοποιείτε την ίδια επιφάνεια κοπής για κρέατα και λαχανικά;»	94
Διάγραμμα 22. Απαντήσεις στο ερώτημα 25 «Χρησιμοποιείτε το ίδιο πιάτο για ωμό και μαγειρεμένο κρέας;»	95
Διάγραμμα 23. Απαντήσεις στην ερώτηση 21 «Πλένετε τα χέρια σας πριν και κατά τη διάρκεια προετοιμασίας φαγητού;»	97
Διάγραμμα 24. Απαντήσεις στο ερώτημα 22 «Τι είδους πάγκο κοπής χρησιμοποιείτε (πολλαπλής επιλογής);»	97
Διάγραμμα 25. Απαντήσεις στο ερώτημα 24 «Σε περίπτωση που κόψετε σε ένα πάγκο κοπής ωμό κρέας και πριν χειριστείτε άλλα τρόφιμα που θα καταναλωθούν ωμά...»	98
Διάγραμμα 26. Απαντήσεις στο ερώτημα 27 «Που τοποθετείτε τα κατεψυγμένα τρόφιμα για να ξεπαγώσουν (πολλαπλής επιλογής);»	100
Διάγραμμα 27. Ιστόγραμμα συχνοτήτων που αφορά τη συνολική βαθμολογία που συγκέντρωσαν οι καταναλωτές και προέκυψε από τη καταγραφή εννέα ερωτήσεων με βαθμολογία (1-5) και δύο ερωτήσεων με βαθμολογία (1-2)	102
Διάγραμμα 28. Scatter plot διάγραμμα που αφορά την βαθμολογία από τις απαντήσεις των εννοιολογικών κατασκευών 1 (πάνω αριστερά), 2 (πάνω δεξιά), 3 (κάτω αριστερά), 4 (κάτω δεξιά) σε συνάρτηση με τη συνολική βαθμολογία των καταναλωτών και ως προς την εμφάνιση τροφολοίμωσης τελευταίους 12 μήνες (ναι \Rightarrow κόκκινες βούλες, όχι \Rightarrow μαύρες βούλες)	103
Διάγραμμα 29. Μέσος πληθυσμός \pm τυπική απόκλιση (log CFU/g) της <i>L. monocytogenes</i> από το 1 ^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε έξι διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών επαφής (ανοξειδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν τρία επίπεδα ενοφθαλμισμού (10^7 , 10^5 , 10^3 CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min.	121
Διάγραμμα 30. Μέσος πληθυσμός \pm τυπική απόκλιση (log CFU/g) της <i>S. Typhimurium</i> από το 1 ^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε έξι διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών (ανοξειδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν τρία επίπεδα ενοφθαλμισμού (10^7 , 10^5 , 10^3 CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min.	122
Διάγραμμα 31. Μέσος πληθυσμός \pm τυπική απόκλιση (log CFU/g) της <i>E. coli</i> O157:H7 από το 1 ^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε έξι διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών (ανοξειδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν τρία επίπεδα ενοφθαλμισμού (10^7 , 10^5 , 10^3 CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min.	123
Διάγραμμα 32. Πληθυσμός <i>S. Typhimurium</i> στις επιφάνειες κοπής (πολυαιθυλένιο, ανοξειδωτος χάλυβας και ξύλο) όπου τεμαχίστηκε το βόειο κρέας (ΕΚΒ), χωρίς ενδιάμεσο καθαρισμό και με εφαρμογή 3 σεναρίων καθαρισμού (με νερό, με νερό και απορρυπαντικό, με απολυμαντικό σπρέι)	134
Διάγραμμα 33. Πληθυσμός βιοϋμενίου (log CFU/cm ²) <i>S. Typhimurium</i> και <i>S. aureus</i> , υπό συνθήκες μονο/δι-καλλιέργειας σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα μετά από επώαση στους 20 °C	

για 144 h και επακόλουθη απολύμανση με χλωριούχο βενζαλκόνιο (BC), υποχλωριώδες νάτριο (NaClO) και υπεροξικό οξύ (PAA).	146
Διάγραμμα 34. Ποσοστά των εναπομείναντων βιοϋμενικών κυττάρων της <i>S. Typhimurium</i> (άσπρο) και <i>S. aureus</i> (μαύρο) σε μικτά βιοϋμένια μετά την απολύμανση (6 min) με PAA (10 ppm), NaClO (10 ppm) και BC (50 ppm). Τα control αφορούν τα δείγματα που δεν απολυμάνθηκαν.	147
Διάγραμμα 35. Μέση μείωση πληθυσμού ± τυπική απόκλιση βιοϋμενικών κυττάρων <i>S. Typhimurium</i> και <i>S. aureus</i> σε μονό- ή μικτή καλλιέργεια μετά την εφαρμογή απόλυμανσης 6 min με χλωριούχο βενζαλκόνιο (BC), υποχλωριώδες νάτριο (SH), υπεροξικό οξύ (PAA).	148
Διάγραμμα 36. Ποσοστιαία αναλογία ανά στέλεχος <i>S. Typhimurium</i> (A) ή <i>S. aureus</i> (B) σε μονό ή μικτό βιοϋμένιο, μετά την εφαρμογή για 6 min τριών απολυμαντικών (BC, PAA και NaClO). Το H ₂ O αναφέρεται σε κουπόνια που εμβαπτίστηκαν σε αποστειρωμένο νερό για 6 min ενώ το πρότυπο αφορά τα κουπόνια που δεν υπέστησαν καμία απολύμανση.	154
Διάγραμμα 37. Σχηματισμός βιοϋμενίου διαφορετικών στελεχών <i>L. monocytogenes</i> (LM), <i>S. aureus</i> (SA), <i>S. Typhimurium</i> (ST), <i>Y. enterocolitica</i> (YE) και <i>E. coli</i> O157:H7 (EC) μετά από 24 h (άσπρες) και 48 h (μαύρες) επώασης στους 37 °C. Τα βιοϋμενικά κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν έμεσα με χρώση crystal violet και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 575nm. Οι μπάρες αντιστοιχούν σε μέσους όρους ± τυπική απόκλιση. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο σχηματισμό βιοϋμενίου μεταξύ των στελεχών για τον ίδιο χρόνο επώασης (24 ή 48 h).	165
Διάγραμμα 38. Πληθυσμός βιοϋμενίου ± τυπική απόκλιση (log CFU/ cm ²) σε γυάλινες επιφάνειες με νανοεπίστρωση (OSG1/OSG2) ή χωρίς (G) από καλλιέργειες 2 στελεχών <i>S. Typhimurium</i> (ST), <i>S. aureus</i> (SA), <i>Y. enterocolitica</i> (YE), <i>E. coli</i> O157:H7 (EC) και <i>L. monocytogenes</i> (LM) και καταμέτρηση στις 3 h (γκρι) και 24 h (άσπρες μπάρες) και επώασης στους 37 °C.	171
Διάγραμμα 39. Πληθυσμός βιοϋμενίου ± τυπική απόκλιση σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα με νανοεπίστρωση (OSS1/OSS2) ή χωρίς (SS) από καλλιέργειες 2 στελεχών <i>S. Typhimurium</i> (ST), <i>S. aureus</i> (SA), <i>Y. enterocolitica</i> (YE), <i>E. coli</i> O157:H7 (EC) και <i>L. monocytogenes</i> (LM) και καταμέτρηση στις 3 (γκρι) και 24 h (άσπρες μπάρες) επώασης στους 37 °C. Διαφορετικά πεζά γράμματα (a,b) αφορούν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο βιοϋμενικό πληθυσμό ανάμεσα στις δύο νανοεπίστρωσεις/πρότυπο και αφορούν τον ίδιο χρόνο επώασης (P < 0,05). Διαφορετικά κεφαλαία γράμματα (A, B) αφορούν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο βιοϋμενικό πληθυσμό ως προς τα παθογόνα για το ίδιο είδος επίστρωσης και αφορούν τον ίδιο χρόνο επώασης (P < 0,05).	172

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1. Τα πέντε πιο συνήθη παθογόνα που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα (CDC, 2011). 3	
Πίνακας 2. Τα πέντε πιο συνήθη παθογόνα που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα που χρήζουν νοσοκομειακής περίθαλψης (CDC, 2011).	3
Πίνακας 3. Τα πέντε πιο συνήθη παθογόνα που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα και σχετίζονται με υψηλή θνησιμότητα (CDC, 2011).	3

Πίνακας 4. Στελέχη τροφιμογενών παθογόνων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη και η προέλευσή τους.....	54
Πίνακας 5. Επίδραση του αρχικού ενοφθαλμισμού, του είδους του μικροοργανισμού, του υλικού της επιφάνειας, του αριθμού του φιλέτου και του χρόνου επαφής, στη μεταφορά των βακτηρίων στα διαδοχικά φιλέτα μέσω της επαφής με τις επιφάνειες (Ανάλυση διακύμανσης)	114
Πίνακας 6. Μεταφορά (log CFU/g) της <i>L. monocytogenes</i> από το 1 ^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε 6 διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών (ανοξειδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν 3 επίπεδα ενοφθαλμισμού (10 ⁷ , 10 ⁵ , 10 ³ CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min. Σε κάθε ομάδα διαφορετικών δειγμάτων κρέατος για το ίδιο επίπεδο ενοφθαλμισμού, τύπο επιφάνειας και χρόνο επαφής διαφορετικοί εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).	118
Πίνακας 7. Μεταφορά (log CFU/g) της <i>S. Typhimurium</i> από το 1 ^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε 6 διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών (ανοξειδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν 3 επίπεδα ενοφθαλμισμού (10 ⁷ , 10 ⁵ , 10 ³ CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min. Σε κάθε ομάδα διαφορετικών δειγμάτων κρέατος για το ίδιο επίπεδο ενοφθαλμισμού, τύπο επιφάνειας και χρόνο επαφής διαφορετικοί εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).	119
Πίνακας 8. Μεταφορά (log CFU/g) της <i>E. coli</i> O157:H7 από το 1 ^ο ενοφθαλμισμένο βόειο φιλέτο σε 6 διαδοχικά φιλέτα μέσω επιφανειών (ανοξειδωτος χάλυβας, πολυαιθυλένιο, ξύλο). Μελετήθηκαν 3 επίπεδα ενοφθαλμισμού (10 ⁷ , 10 ⁵ , 10 ³ CFU/g) και τα φιλέτα ήρθαν σε επαφή με τις επιφάνειες για 1 ή 15 min. Σε κάθε ομάδα διαφορετικών δειγμάτων κρέατος για το ίδιο επίπεδο ενοφθαλμισμού, τύπο επιφάνειας και χρόνο επαφής διαφορετικοί εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$).	120
Πίνακας 9. Πληθυσμός του παθογόνου <i>S. enterica</i> Typhimurium σε (1) βόεια φιλέτα επιμολυσμένα με το παθογόνο (ΒΦ), (2) επιφάνεια κοπής μετά την επαφή με το βόειο φιλέτο (ΕΚΒ), (3) το μαχαίρι κοπής του βόειου φιλέτου (ΜΒ), (4) η ντομάτα που ήρθε σε επαφή με την ίδια επιφάνεια (Το), (5) η επιφάνεια κοπής μετά την επαφή με την ντομάτα (ΕΚΤ) και (6) το μαχαίρι κοπής της ντομάτας (ΜΤ). Μελετήθηκαν τρεις τύποι πάγκων κοπής (ξύλο, ΞΥ, πολυαιθυλένιο, ΠΕ, ανοξειδωτος χάλυβας, ΑΧ) και τέσσερα διαφορετικά σενάρια καθαρισμού/απολύμανσης (μη καθαρισμός (ΧΚ), Καθαρισμός μόνο με νερό (ΚΝ), καθαρισμός με νερό και σαπούνι (ΚΣ) και χρήση απολυμαντικού σπρέι (ΑΣ)	132
Πίνακας 10. Ποσοστό (%) των θετικών επιφανειών και μαχαιριών στις οποίες ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο αρίθμησης (εμπλουτισμός με Rappaport- Vasiliadis Broth).....	135
Πίνακας 11. Επίπεδα μεταφοράς της <i>S. Typhimurium</i> (%) από τα βόεια φιλέτα (ΒΦ) στις επιφάνειες κοπής (ΕΚ) και από αυτές στη ντομάτα (Το), χωρίς ενδιάμεσο καθαρισμό και με καθαρισμό με νερό των επιφανειών πολυαιθυλενίου (ΠΕ), ανοξειδωτου χάλυβα (ΑΧ) και ξύλου (ΞΥ)	136
Πίνακας 12. Μελέτες που διερευνούν το σχηματισμό μονών/ μικτών βιοϋμενίων και την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών ενάντια σε αυτά (μετασχηματισμός από Sanchez-Vizuet et al., 2015).....	141
Πίνακας 13. Βιοϋμενικός πληθυσμός των <i>S. Typhimurium</i> και <i>S. aureus</i> (log CFU/ cm ²) σε μονή/μικτή καλλιέργεια και μετά τη χρήση απολυμαντικών (χλωριούχο βενζαλκόνιο, υποχλωριώδες νάτριο, υπεροξικό οξύ).....	149

Παράρτημα Β

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά άρθρα με κριτές

1. Gkana, E., Lianou, A., Nychas, G.-J.E. Transfer of *Salmonella* enterica ser. Typhimurium from beef to tomato through kitchen equipment and the efficacy of intermediate decontamination procedures. *Journal of Food Protection* 79:1252-1258
2. Papadopoulou, O., Chorianopoulos, N., Gkana, E., Grounta, A., Koutsoumanis, K., Nychas, G.-J.E. (2012) Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. *Meat Science* 90:865–869
3. Gkana, E., Chorianopoulos, N., Grounta, A., Koutsoumanis, K., Nychas, G.-J. E. Effect of inoculum size, bacterial species, type of surfaces and contact time to the transfer of foodborne pathogens from inoculated to non-inoculated beef fillets via food processing surfaces (**Submitted to Food Microbiology**)
4. Gkana, E., & Nychas, G.-J.E. Consumer food safety perceptions and self-reported practices in Greece (**Submitted to International Journal of Consumer studies**)
5. Gkana, E., Giaouris, E., Doulgeraki, A., Kathariou, S., Nychas, G.-J. E. Biofilm formation by *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* on stainless steel under either mono- or dual-species multi-strain conditions and resistance of sessile communities to sub-lethal chemical disinfection (**Submitted to Food Control**)



Research Note

Transfer of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from Beef to Tomato through Kitchen Equipment and the Efficacy of Intermediate Decontamination Procedures

E. GKANA, A. LIANO, AND G.-J. E. NYCHIAS*

Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Human Nutrition, School of Food, Biotechnology and Development, Agricultural University of Athens, Iera Odis 15, Athens 11527, Greece

MS 15-531; Received 19 November 2015/accepted 6 March 2016

ABSTRACT

It is well established that a high percentage of foodborne illness is caused by failure of consumers to prepare food in a hygienic manner. Indeed, a common practice in households is to use the same kitchen equipment for both raw meat and fresh produce. Such a practice may lead to cross-contamination of fruits and vegetables, which are mainly consumed without further processing, with pathogenic microorganisms originating from raw meat. The present study was performed to examine the transfer of the pathogenic bacterium *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from marinated beef fillets to tomatoes via contact with high density polyethylene (PE), stainless steel (SS), and wooden (WD) surfaces and through cutting with SS knives. Furthermore, the following decontamination procedures were applied: (i) rinsing with tap water, (ii) scrubbing with tap water and liquid dish detergent, and (iii) using a commercial antibacterial spray. When surfaces and knives that came into contact with contaminated beef fillets were not cleaned prior to handling tomatoes, the lowest level of pathogen transfer to tomatoes was observed through PE surfaces. All of the decontamination procedures applied were more effective on knives than on surfaces, while among the surface materials tested, WD surfaces were the most difficult to decontaminate, followed by PE and SS surfaces. Mechanical cleaning with tap water and detergent was more efficient in decontaminating WD surfaces than using commercial disinfectant spray, followed by rinsing only with water. Specifically, reductions of 2.07 and 1.09 log CFU/cm² were achieved by washing the WD surfaces with water and detergent and spraying the surfaces with an antimicrobial product, respectively. Although the pathogen's populations on SS and PE surfaces, as well as on tomatoes, after both aforementioned treatments were under the detection limit, the surfaces were all positive after enrichment, and thus, the potential risk of cross-contamination cannot be overlooked. As demonstrated by the results of this study, washing or disinfection of kitchen equipment may not be sufficient to avoid cross-contamination of ready-to-eat foods with foodborne pathogens, depending on the decontamination treatment applied and the material of the surfaces treated. Therefore, separate cutting boards and knives should be used for processing raw meat and preparing ready-to-eat foods in order to enhance food safety.

Key words: Cross contamination; Decontamination; Meat; Produce; Surface

Συμμετοχές σε συνέδρια- ημερίδες

α) Προφορικές ανακοινώσεις:

1. Ε. Γκάνα, Α. Γρούντα, Ν. Γ. Χωριανόπουλος, Α. Σταματίου, Κ. Π. Κουτσομανής και Γ.-Ι.Ε. Νυχάς. Ποσοτικός προσδιορισμός της μεταφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* από επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων σε φιλέτα βοείου κρέατος. Meat and meat products 2010, 24-26 September, Athens, Greece.
2. Α. Γρούντα, Ε. Γκάνα, Ν. Γ. Χωριανόπουλος, Β. Ηλιόπουλος, Κ. Π. Κουτσομανής και Γ.-Ι. Ε. Νυχάς. Μελέτη της διασταυρούμενης επιμόλυνσης φιλέτων μόσχου από βιοϋμενικά κύτταρα του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*. Meat and meat products 2010, 24-26 September, Athens, Greece.
3. Ο. Παπαδοπούλου, Ε. Γκάνα, Α. Γρούντα, Ν. Γ. Χωριανόπουλος, Κ. Π. Κουτσομανής και Γ.-Ι.Ε. Νυχάς. Ποσοτικός προσδιορισμός της μεταφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella enterica* ser. Typhimurium από μηχανή κιμά σε φιλέτα βοείου κρέατος. Meat and meat products 2010, 24-26 September, Athens, Greece.
4. Ο. Papadopoulou, E. Gkana, A. Grounta, N. G. Chorionopoulos, K. P. Koutsoumanis and G.-J. E. Nychas. Transfer of *Salmonella enterica* ser. Typhimurium to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. Advancing Beef Safety and Quality through Research and Innovation. 6 - 7th October 2010 Aberystwyth, Wales UK.
5. E. Gkana, A. Grounta, N. G. Chorionopoulos, A. Stamatiou, K. P. Koutsoumanis and G.-J. E. Nychas. Transfer of *Listeria monocytogenes* from food processing surfaces to non-inoculated beef fillets. Advancing Beef Safety and Quality through Research and Innovation. 6 - 7th October 2010 Aberystwyth, Wales UK.
6. Grounta, E. Gkana, N. G. Chorionopoulos, V. Iliopoulos, K. P. Koutsoumanis and G.-J. E. Nychas. Transfer of *Listeria monocytogenes* biofilm cells to non-inoculated beef fillets. Advancing Beef Safety and Quality through Research and Innovation. 6 - 7th October 2010 Aberystwyth, Wales UK.
7. Α. Γρούντα, Ε. Γκάνα, Ν. Γ. Χωριανόπουλος, Β. Ηλιόπουλος, Κ. Π. Κουτσομανής, Ε.Ζ. Πανάγου, και Γ.-Ι. Ε. Νυχάς. Μελέτη της διασταυρούμενης επιμόλυνσης φιλέτων μόσχου από βιοϋμενικά κύτταρα των παθογόνων βακτηρίων *E. coli* O157:H7 και

- Salmonella enterica* ser. Typhimurium. 3rd Mikrobiokosmos Conference 16 – 18 December 2010 Thessaloniki, Greece.
8. Ο. Παπαδοπούλου, Ε. Γκάνα, Α. Γρούντα, Ν. Γ. Χωριανόπουλος, Κ. Π. Κουτσουμανής, Ε.Ζ. Πανάγου και Γ.-Ι. Ε. Νυχάς. Ποσοτικός προσδιορισμός της μεταφοράς των παθογόνων μικροοργανισμών *Escherichia coli* O157H7 και *Listeria monocytogenes* Scott A από μηχανή κιμά σε φιλέτα βοείου κρέατος. 3rd Mikrobiokosmos Conference 16 – 18 December 2010 Thessaloniki, Greece.
 9. Α. Γρούντα, Ε. Γκάνα, Ν. Γ. Χωριανόπουλος, Α. Σταματίου, Β. Ηλιόπουλος, Κ. Π. Κουτσουμανής, Ε. Πανάγου και Γ.-Ι. Ε. Νυχάς. Βιοϋμενικά κύτταρα έναντι πλαγκτονικών: σύγκριση του βαθμού διασταυρούμενης επιμόλυνσης φιλέτων μόσχου από τα παθογόνα βακτηρία *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 και *Salmonella* ser. Typhimurium. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τροφίμων 11-13 Νοεμβρίου 2011, Θεσσαλονίκη
 10. Ε. Νικολιδάκη, ΛΜ. Κορού, Α. Αλυγιζάκη, Α. Μπάου, Ε. Γκάνα, Π. Κατίκου. Παρακολούθηση των κατηγοριοποιημένων ζωνών παραγωγής ζώντων δίθυρων μαλακίων της χώρας, για παρουσία βιοτοξινών και τοξικού φυτολαγκτού, κατά τη τριετία 2008-2010 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τροφίμων 11-13 Νοεμβρίου 2011, Θεσσαλονίκη
 11. Ελένη Ν. Γκάνα, Αγάπη Ι. Δουλγεράκη, Γεώργιος-Ιωάννης Ε. Νυχάς Προσδιορισμός της επίδρασης του στελέχους σε μικτή καλλιέργειας *Salmonella enterica* Typhimurium κατά τη διάρκεια διασταυρούμενης επιμόλυνσης αβιοτικών επιφανειών από βόεια μπιφτέκια. Πανελλήνιο Συνέδριο για το κρέας και τα προϊόντα του. Από το στάβλο στο πιάτο. 27 Φεβρουαρίου- 1 Μαρτίου 2015, Θεσσαλονίκη
 12. Α. Ι. Δουλγεράκη, Ε. Γκάνα, Ε. Γκιαούρης, Σ. Καθάρου, Γ.-Ι.Ε. Νυχάς Ανθεκτικότητα βιοϋμενικών κυττάρων *Salmonella* Typhimurium και *Staphylococcus aureus* υπό συνθήκες μονο- και μικτής καλλιέργειας σε υποθανάτιες συγκεντρώσεις χλωριούχου βενζαλκονίου, υπεροξικού οξέος και υποχλωριώδους νατρίου. 6ο Συνέδριο Μικροβιόκοσμος 3-5 Απριλίου 2015, Αθήνα
 13. D. Sardella, P. Natskoulis, E. Gkana, E. Panagou, V. Valdramidis. Characterization of the interactions between a biofilm forming bacterium and fungi related to pear fruit diseases. National Symposium of Health Sciences and Dean's Awards Faculty of Health Sciences - Univeristy of Malta, 16th March 2016
 14. Antouva, A., Gkana E., Lianou, A., and Nychas G-J.E. Assessment of the Biofilm Formation Interactions between *Cronobacter sakazakii* and *Bacillus subtilis*. 11-13 May 2016. IAFP European Symposium on Food Safety. Athens Greece

β) Αναρτημένες ανακοινώσεις:

1. Ε. Γκάνα, Α. Γρούντα, Ν. Γ. Χωριανόπουλος, Α. Σταματίου, Κ. Π. Κουτσομανής, Ε.Ζ. Πανάγου και Γ.-Ι.Ε. Νυχάς. Ποσοτικός προσδιορισμός της μεταφοράς των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella enterica* ser. Typhimurium και *Escherichia coli* O157:H7 από επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων σε φιλέτα βοείου κρέατος. 3rd Mikrobiokosmos Conference 16 – 18 December 2010 Thessaloniki, Greece.
2. Ε. Γκάνα, Ε.Ζ. Πανάγου και Γ.-Ι. Ε. Νυχάς. Μεταφορά του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella* ser. Typhimurium από φιλέτα βόειου κρέατος σε ντομάτες διαμέσου του οικιακού εξοπλισμού. 3rd Mikrobiokosmos Conference 16 – 18 December 2010 Thessaloniki, Greece.
3. Ε. Γκάνα, Ε. Πανάγου, Γ.Ι.Ε. Νυχάς. Επιβίωση και μεταφορά του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella enterica* ser. typhimurium σε αβιοτικές επιφάνειες από βόεια μπιφτέκια. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Τροφίμων 11-13 Νοεμβρίου 2011, Θεσσαλονίκη
4. E. Gkana, A. Grounta, N. G. Chorionopoulos, A. Stamatiou, K. P. Koutsoumanis and G.-J. E. Nychas. Transfer of *Salmonella enterica* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 from food processing surfaces to non-inoculated beef fillets. Advancing Beef Safety and Quality through research and innovation 7-9 December 2012 Dublin, Ireland
5. E. Gkana, E.Z. Panagou, and G.-J.E. Nychas. Survival and transfer efficacy of *Salmonella enterica* ser. Typhimurium from beef burgers to abiotic surfaces. Advancing Beef Safety and Quality through research and innovation 7-9 December 2012 Dublin, Ireland
6. E. Gkana, E.Z. Panagou, and G.-J.E. Nychas. Transfer of pathogen *Salmonella* Typhimurium from beef fillets to tomatoes through kitchen equipment. Advancing Beef Safety and Quality through research and innovation 7-9 December 2012 Dublin, Ireland
7. O. Papadopoulou, E. Gkana, A. Grounta, N. G. Chorionopoulos, K. P. Koutsoumanis and G.-J. E. Nychas. Transfer of *Escherichia coli* O157H7 and *Listeria monocytogenes* scott A to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. Advancing Beef Safety and Quality through research and innovation 7-9 December 2012 Dublin, Ireland
8. E. Gkana, A. Grounta, N. Chorionopoulos, E. Panagou, G.-J.E. Nychas. Transfer of foodborne pathogens via food processing surfaces to beef fillets. 1-4 September 2014 Nantes, France

9. Eleni N. Gkana, Agapi I. Doulgeraki, George-John E. Nychas. Evaluation of biofilm formation of 5 foodborne pathogens on glass surfaces coated with silica nanoparticles. 29th Effost International conference 10-12 November 2015, Athens
10. Gkana, E., Doulgeraki, A.I., Nychas, G-J.E. Evaluation of biofilm formation of 5 foodborne pathogens on stainless surfaces coated with silica nanoparticles. 6th Joint congress of Microbiology and Biotechnology: Microbiotec15. 10-12 December 2015, Evora
11. Gkana, E., Lappa I., Nychas, G-J.E, Panagou E. Evaluation of mixed biofilm development of *Aspergillus carbonarius* with *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Pentosus*. 25th International Conference- Food Micro, 19-22 July 2016, Dublin, Ireland
12. Kandaraki, E., Lianou, A., Gkana E., and Nychas G-J.E. Biofilm Formation of *Streptococcus macedonicus* under Monospecies and Dual-species (with Foodborne Pathogens) Conditions. 11-13 May 2016. IAFP European Symposium on Food Safety. Athens Greece
13. Gkana E., Natskoulis P., Nychas, G-J.E, Panagou E. Growth and biofilm formation of *Aspergillus carbonarius* in microtiter plates depends on initial inoculum and substrate composition. 11-13 May 2016. IAFP European Symposium on Food Safety. Athens Greece
14. Gkana E., Nychas F-J.E. (2016) Safe Food Handling: Knowledge, Perceptions and Self-Reported Practices of Greek Consumers. 11-13 May 2016. IAFP European Symposium on Food Safety. Athens Greece