

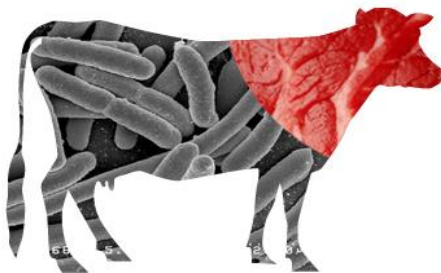


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΠΟΤΩΝ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ, ΤΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ & ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΕΠΕΙΤΑ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *Escherichia coli* O157:H7 ΣΕ ΒΟΕΙΟ ΚΙΜΑ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΚΑΝΑΚΑΚΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ, 2015

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ, ΤΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ & ΤΟΥ
ΡΥΘΜΟΥ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΕΠΕΙΤΑ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *Escherichia coli* O157:H7 ΣΕ ΒΟΕΙΟ ΚΙΜΑ**

ΚΑΝΑΚΑΚΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Σκανδάμης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γιαννιώτης Σταυριανός, Καθηγητής Γ.Π.Α

Πανάγου Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

Σκανδάμης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α (Επιβλέπων)

Αθήνα, 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στα πλαίσια του μεταπτυχιακού κύκλου των σπουδών μου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, μου δόθηκε η ευκαιρία να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου μελέτη με τίτλο: Η επίδραση της λιποπεριεκτικότητας, της διάρκειας και του ρυθμού κατάψυξης στη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7 σε βόειο κιμά. Η πειραματική πορεία είχε διάρκεια 7 μήνες και διεξήχθη στο εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών.

Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης χρειάστηκε η συνεργασία με ανθρώπους καταξιωμένους στους οποίους οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την κατανόηση και τη βοήθεια που μου παρείχαν απλόχερα όλο αυτό το διάστημα. Πρώτον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα αυτής της μελέτης κ. Σκανδάμη Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της εν λόγω εργασίας καθώς επίσης για τις επιστημονικές γνώσεις που μου παρείχε απλόχερα όλο το διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριο. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς οφείλω στον υπεύθυνο μου, μεταδιδάκτορα κ. Μανιό Σταύρο για την καθοδήγηση του και τις χρήσιμες επισημάνσεις του. Η παρουσία του ήταν αναντίρρητα καταλυτική για την εκπόνηση της μελέτης. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την έκφραση θερμών ευχαριστιών στην συμφοιτήτρια και φίλη μου Μποσιώλη Αικατερίνη για την αμέριστη προσφορά και την στήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής πορείας. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να πω σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου καθώς και στις συμφοιτήτριες και φίλες μου Σιδεράκου Δανάη, Ζωή Αποστολίδου και Μαρία Γκερέκου για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα εντός εργαστηρίου.

Τους ευχαριστώ όλους θερμά!

Κανακάκη Ευαγγελία

Αθήνα, 2015

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	9
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ	11
1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΚΡΕΑΤΟΣ ΣΕ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΕΠΙΠΕΔΟ.....	11
1.3 ΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΣΤΟ ΚΡΕΑΣ.....	13
1.4 Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ <i>Escherichia coli</i>	15
1.4.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ.....	15
1.4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ.....	16
1.4.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ & ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ.....	18
1.4.3.1 ΕΝΤΕΡΟΑΙΜΟΡΑΓΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (ΕΗΕC).....	18
1.4.3.1.1 ΤΟΞΙΝΕΣ VT / STX.....	19
1.4.3.1.2 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΕΗΕC (VTEC, STEC).....	20
1.4.3.2 ΕΝΤΕΡΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (ΕΡΕC).....	21
1.4.3.3 ΕΝΤΕΡΟΕΙΣΒΟΛΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (ΕΙΕC).....	22
1.4.3.4 ΕΝΤΕΡΟΤΟΞΙΓΕΝΗ ΣΤΕΛΕΧΗ (ΕΤΕC).....	22
1.4.3.5 ΕΝΤΕΡΟΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (ΕΑΕC).....	23
1.5 ΚΡΟΥΣΜΑΤΑ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΛΟΓΩ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ <i>E. coli</i> O157:H7	24
1.5.1 ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ <i>E. coli</i> O157:H7 ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΚΡΕΑΤΟΣ ...	25
1.6 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ <i>E. coli</i> O157:H7 ΣΕ ΜΠΙΦΤΕΚΙΑ ΑΠΟ ΒΟΕΙΟ ΚΙΜΑ.....	28
1.7 ΤΡΟΠΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ <i>E. coli</i> O157:H7.....	30
1.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΤΑ ΜΠΙΦΤΕΚΙΑ ΑΠΟ ΒΟΕΙΟ ΚΡΕΑΣ.....	32
1.8.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΑΓΕΙΡΕΜΑΤΟΣ	33
1.8.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΨΗΣΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΧΡΩΜΑ.....	35
1.9 Η ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ <i>E. coli</i> O157:H7	36
1.9.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ <i>E. coli</i> O157:H7	37
1.9.1.1 ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΝΑΤΡΙΟ	37
1.9.1.2 ΛΙΠΟΣ.....	38
1.9.1.3 ΚΑΤΑΨΥΞΗ	40
1.9.1.4 ΜΕΓΕΘΟΣ ΜΠΙΦΤΕΚΙΩΝ	42

1.10 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΙΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΙΣ.....	43
1.10.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΨΥΞΗΣ	44
1.10.2 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ.....	46
1.10.3 ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ.....	47
1.11 ΥΠΟΘΕΣΗ & ΣΤΟΧΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	48
1.12 ΣΚΟΠΟΣ.....	49
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	50
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	50
2.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΟΛΙΟΥ.....	51
2.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	53
2.2.2 ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΟΕΙΩΝ ΜΠΙΦΤΕΚΙΩΝ	54
2.2.3 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ – ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	55
2.2.4 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ	56
2.3 ΠΡΟΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	57
2.3.1 1 ^ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	57
2.3.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1 ^{ου} ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ	58
2.3.2 2 ^ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	59
2.3.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2 ^{ου} ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ.....	59
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ.....	61
3.1.1 Η ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΨΥΞΗ.....	62
3.2 Η ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟΥΣ 65 °C	64
3.2.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗ 0 ^η ΜΕΡΑ	64
3.2.1.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΛΙΠΟΥΣ.....	65
3.2.1.2 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NaCl	65
3.2.1.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΜΕΓΕΘΟΥΣ.....	66
3.2.2 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΝ 1 ^η ΜΕΡΑ.....	67
3.2.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΝ 20 ^η ΜΕΡΑ.....	69
3.2.3.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΛΙΠΟΥΣ.....	70
3.2.3.2 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NaCl	70
3.2.3.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΜΕΓΕΘΟΥΣ.....	71

3.2.3.4 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ.....	71
3.3 Η ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟΥΣ 71 °C	73
3.3.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗ 0 ^η ΜΕΡΑ.....	73
3.3.2 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΝ 1 ^η ΜΕΡΑ	74
3.3.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΝ 20 ^η ΜΕΡΑ.....	75
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	78
4.1 Η ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ & ΤΟΥ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	78
4.2 Η ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ	80
5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις μέρες μας, είναι γεγονός ότι υπάρχει αύξηση του καταναλωτικού ενδιαφέροντος στα έτοιμα προς μαγείρεμα προϊόντα. Παράδειγμα αποτελούν τα μπιφτέκια από βόειο κρέας τα οποία καταναλώνονται με μεγάλη συχνότητα σε παγκόσμιο επίπεδο. Παρά τις αυστηρές υποδείξεις των αρχών για τους ασφαλέστερους τρόπους μαγειρέματος, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν καταγραφεί πολλά κρούσματα σε μπιφτέκια που είχαν επιμολυνθεί από τον παθογόνο μικροοργανισμό *Escherichia coli* O157:H7. Μεγάλο μέρος της έρευνας έχει στραφεί στον τρόπο εξάλειψης αυτού του παθογόνου. Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι η επίδραση του ρυθμού και της διάρκειας κατάψυξης βόειων μπιφτεκιών διαφορετικής σύστασης στη θερμοανθεκτικότητα του *E. coli* O157:H7. Συσκευασμένα κομμάτια βόειου κρέατος τεμαχίστηκαν και παρασκευάστηκε κιμάς μέσω κιμαδομηχανής. Έπειτα ακολούθησε η ζύγιση 500 g βόειου κιμά και η τοποθέτηση του σε αποστειρωμένες σακούλες οι οποίες εμβολιάστηκαν με μίγμα 3 στελεχών του *E. coli* O157:H7 με σκοπό την επίτευξη των επιπέδων 7.0 log CFU / g υπό ασηπτικές συνθήκες. Σχηματίστηκαν μπιφτέκια τα οποία υποβλήθηκαν σε μικροβιολογική ανάλυση αμέσως μετά το σχηματισμό τους και μπιφτέκια τα οποία υποβλήθηκαν σε θερμική καταπόνηση και έπειτα πραγματοποιήθηκε σε αυτά μικροβιολογική ανάλυση. Τα δείγματα συντηρούνταν στους -16 °C και στους -28 °C και οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν τη 0^η, την 1^η και την 20^η μέρα. Ο παράγοντας λίπος επηρέασε την θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού καθώς παρατηρήθηκε μεγαλύτερη επιβίωση στα δείγματα με 30 % λίπος μέχρι και 1.7 λογαριθμικούς κύκλους συγκριτικά με τα άπαχα. Επίσης, η χαμηλότερη θερμοκρασία κατάψυξης σε συνδυασμό με το μεγάλο χρόνο συντήρησης οδήγησε στην ανάκτηση της εγγενούς θερμοανθεκτικότητας. Το μέγεθος δεν επηρέασε την θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου καθώς το NaCl λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης του, έδρασε ανασταλτικά μειώνοντας την επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού μέχρι και 1.4 λογαριθμικούς κύκλους. Τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι στα κατεψυγμένα μπιφτέκια υπάρχει μειωμένος κίνδυνος από το *E. coli* O157:H7 από ότι στα φρέσκα, όμως η παρατεταμένη διάρκεια κατάψυξης δύναται να ευνοήσει την μερική ανάκτηση της θερμοανθεκτικότητας του παθογόνου.

Λέξεις κλειδιά: *Escherichia coli* O157:H7, θερμοανθεκτικότητα, κατάψυξη, λίπος, NaCl, μπιφτέκια από βόειο κιμά.

ABSTRACT

Nowadays, it goes without saying that there is an increasing consumer interest in ready-to-cook products. Examples are beef burgers that consumed with high frequency worldwide. Despite the strict recommendations of the authorities for the safest ways of cooking, the last decades many outbreaks have been recorded in beef burgers that were contaminated by the pathogen *Escherichia coli* O157:H7. Much research has focused on how this pathogen will be eliminated. The aim of this study is the effect of freezing rate and frozen storage duration on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 during cooking of beef burgers of different formulation. Packed beef pieces were sliced and minced was prepared by machine minced meat. Afterwards 500 g of minced beef were weighed and placed in sterile bags which were inoculated with a three-strain composite of *E. coli* O157:H7 in order to achieve the levels of 7.0 log CFU / g under aseptic conditions. Beef burgers were formed and subjected to microbiological analysis immediately after their formation and also ones which were heat treated and then were held at microbiological analysis. Samples were stored at -16 °C and -28 °C and the samplings were carried out on the 0, 1 and 20 day. Fat affected the heat resistance of the pathogen as well as higher survival was observed in the samples with 30 % fat, up to 1.7 logarithmic cycles compared to lean samples. Furthermore, lower storage temperature for longer periods led to a partial recovery of the innate heat tolerance. Size did not affect the heat resistance of the pathogen while NaCl due to its low concentration, acted inhibitory decreasing the survival of the pathogen until 1.4 logarithmic cycles. Results suggest that frozen beef burgers have reduced risk of *E. coli* O157:H7 compared with fresh ones, therefore long-term frozen storage may enhance the heat tolerance of *E. coli* O157:H7.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, heat resistance, freezing, fat, NaCl, beef patties

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σε κάθε εποχή και σε κάθε κοινωνία, οι διατροφικές συνήθειες διαμορφώνονται ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες και συνθήκες που επικρατούν. Στις μέρες μας, η ανάγκη ικανοποίησης των πολλαπλών αναγκών επιβάλλει γρήγορους και εξαντλητικούς ρυθμούς ζωής. Η κυριαρχία του εργάσιμου χρόνου τείνει να μετατρέψει τον ελεύθερο χρόνο σε μία έννοια κενής περιεχομένου. Οι έντονες κοινωνικο-οικονομικές αλλαγές, η αύξηση των εισοδημάτων στις αναπτυγμένες χώρες και η ταχεία αστικοποίηση, έχουν οδηγήσει στην αύξηση των απαιτήσεων του καταναλωτικού κοινού σε έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, ιδιαίτερα σε κατεψυγμένη μορφή (MacKenzie, 2011).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων τροφίμων αποτελούν τα μπιφτέκια από βόειο κρέας που καταναλώνονται με μεγάλη συχνότητα σε παγκόσμιο επίπεδο. Τα μπιφτέκια μπορούν να παρασκευαστούν εύκολα και γρήγορα στο σπίτι, είτε σε κέντρα μαζικής εστίασης είτε σε βιομηχανίες τροφίμων και διανέμονται σε αλυσίδες σούπερ μάρκετ διατηρούμενα υπό ψύξη ή κατάψυξη. Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Wyndmoor στην Αμερική, υπάρχει μεγάλη γκάμα των προϊόντων αυτών όσον αφορά τη σύσταση, το σχήμα, το πάχος και τον τρόπο συντήρησής τους (Luchnansky *et al.*, 2013). Η ποικιλία αυτή καταδεικνύει την ολοένα και μεγαλύτερη ζήτηση των καταναλωτών για το συγκεκριμένο προϊόν.

Επιπλέον, η πρωτοφανής ανάπτυξη των κέντρων μαζικής εστίασης, αποδεικνύει ότι η κατανάλωση έτοιμων προς μαγείρεμα προϊόντων (ready to cook) έχει αναχθεί σε μόδα. Τεράστια χρηματικά ποσά έχουν επενδυθεί στη δημιουργία αλυσίδων όπως για παράδειγμα τα McDonald's και τα Burger King οι οποίες ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις μιας συνεχώς διευρυμένης αγοράς. Για παράδειγμα, η αγορά των μπέργκερς στις ΗΠΑ εκτιμάται στα 65 εκατομμύρια δολάρια και συνεχίζει να αυξάνεται. Σε πρόσφατη έρευνα, το 85 % των ερωτηθέντων καταναλωτών δήλωσε ότι καταναλώνει μπέργκερς τουλάχιστον μία φορά το μήνα (Pettrak, 2010). Η ολοένα και μεγαλύτερη αύξηση του καταναλωτικού ενδιαφέροντος στα συγκεκριμένα προϊόντα τα συγκαταλέγει μεταξύ των δημοφιλέστερων που καταναλώνονται με μεγάλη συχνότητα σε παγκόσμιο επίπεδο.

Σύμφωνα λοιπόν με τις σύγχρονες διατροφικές συνήθειες παρατηρείται ότι η αυξανόμενη πολυπλοκότητα στην αλυσίδα μεταποίησης των τροφίμων έχει δημιουργήσει νέους δυνητικούς κίνδυνους. Τις τελευταίες δεκαετίες παρουσιάζεται αύξηση της επικράτησης των ασθενειών και συγκεκριμένα έχουν καταγραφεί πολλά κρούσματα σε μπιφτέκια που είχαν επιμολυνθεί από τον παθογόνο μικροοργανισμό *Escherichia coli* O157:H7. Αναμφίβολα τα μπιφτέκια αποτελούν ένα προϊόν με μεγάλη ζήτηση. Λόγω των πολλαπλών κρουσμάτων, μεγάλο μέρος της έρευνας έχει στραφεί στον τρόπο εξάλειψης αυτού του παθογόνου.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

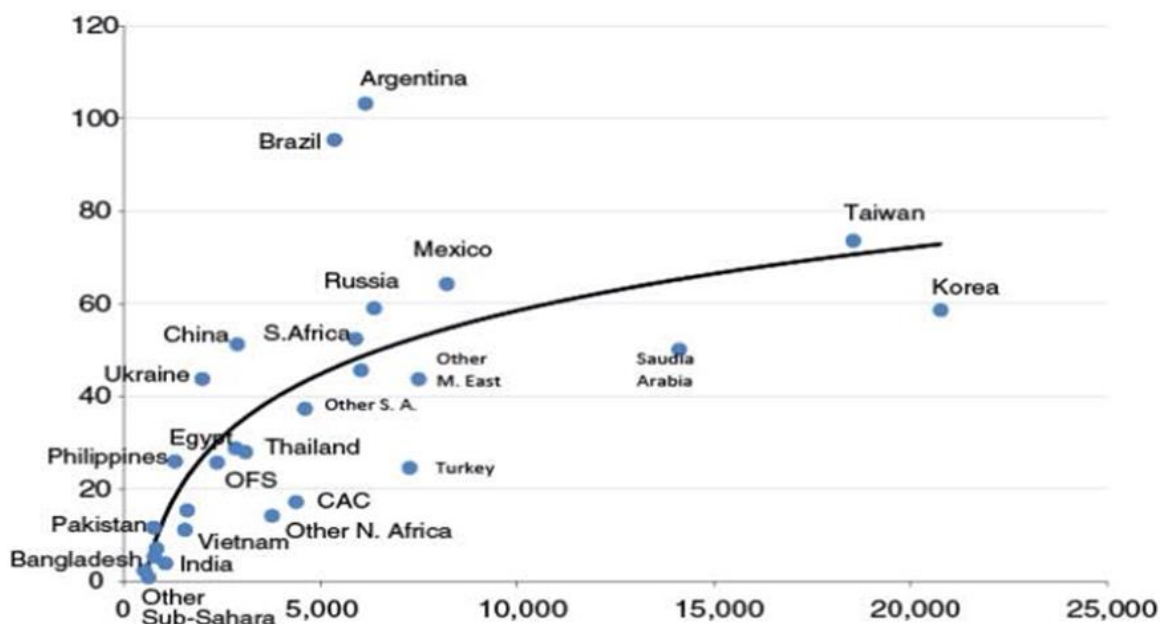
1.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2009), με τον όρο νωπό κρέας χαρακτηρίζονται *“τα τμήματα των σφαγίων των θερμόαιμων ζώων και πτηνών, που είναι κατάλληλα για τη διατροφή του ανθρώπου και τα οποία διατίθενται όπως είναι χωρίς καμία επεξεργασία, εκτός από τον τεμαχισμό και τη ψύξη”*. Το κρέας αποτελεί εδώ και πολλά χρόνια σημαντικό μέρος του τρόπου διατροφής, προσφέροντας μια υψηλής ποιότητας πηγή πρωτεϊνών για την κάλυψη των αναγκών. Αποτελεί αξιόλογη πηγή απορροφήσιμου σιδήρου και είναι απαραίτητο συστατικό της διατροφής, ιδιαίτερα κάποιων συγκεκριμένων ομάδων όπως τα παιδιά, οι έφηβοι, οι έγκυες και οι θηλάζουσες μητέρες, οι ηλικιωμένοι και οι αθλητές (Hamn, 1991). Το κρέας δεν αποτελείται μόνο από λιπαρά οξέα και πρωτεΐνες, αλλά και από μικροθρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη. Ο σίδηρος, το σελήνιο και ο ψευδάργυρος αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα μικροθρεπτικών συστατικών. Στο συκώτι περιέχονται επίσης και όλες σχεδόν οι βιταμίνες και τα ιχνοστοιχεία σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Biesalski, 2002).

1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΚΡΕΑΤΟΣ ΣΕ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Από τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, το κρέας και τα προϊόντα του σε παγκόσμιο επίπεδο αντιπροσωπεύουν ένα κολοσσιαίο οικονομικό κεφάλαιο το οποίο δεν είναι καθόλου εύκολο να αποτιμηθεί. Μεγάλες κτηνοτροφικές μονάδες έχουν εγκατασταθεί σε όλο τον κόσμο παράγοντας τεράστιες ποσότητες κρέατος, οι οποίες διατίθενται στο εμπόριο προς κατανάλωση. Όσον αφορά τις αναπτυσσόμενες και τις αναπτυγμένες χώρες, μπορεί να υπάρχουν ακόμη σημαντικές διαφορές μεταξύ αυτών, ωστόσο οι αναπτυσσόμενες ανακάμπτουν σημαντικά σε αυτό το πεδίο (USDA, 2013) (Διάγραμμα 1.2.1). Οι καταναλωτές έχουν στη διάθεσή τους μία ευρεία γκάμα από

είδη και προϊόντα κρέατος που ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις και τις προτιμήσεις τους. Το 70,4 % της ετήσιας παγκόσμιας παραγωγής κρέατος (152.043.940 τόνοι) προέρχεται από την εκτροφή βοοειδών, χοίρων, πουλερικών, προβάτων αιγών και βουβάλων (Γεωργάκης, 2005).



Διάγραμμα 1.2.1 Η κατά κεφαλήν κατανάλωση κρέατος (kg ανά έτος) το χρονικό διάστημα 2009-2011 βασιζόμενη τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις αναπτυγμένες χώρες (USDA, 2013).

Από τα παραγωγικά ζώα τα οποία εξημέρωσε και εκτρέφει ο άνθρωπος, τα βοοειδή σε παγκόσμια κλίμακα είναι τα σπουδαιότερα καθώς συνέβαλαν με τις πληθωρικές παραγωγικές ιδιότητες τους (γαλακτοπαραγωγή, κρεοπαραγωγή, δυναμοπαραγωγή). Σήμερα η βοοτροφία κατέχει την πρώτη θέση στην παγκόσμια παραγωγή γάλακτος (86,4 %) και τη δεύτερη θέση μετά τη χοιροτροφία (40,3 %) στην παγκόσμια παραγωγή κρέατος (25,0 %).

Το βόειο κρέας αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα είδη κρέατος. Όσον αφορά τα συστατικά του, το νερό θεωρείται ύψιστης σημασίας και παρευρίσκεται σε ποσοστό

75 %. Επιπλέον το ποσοστό των πρωτεϊνών μπορεί να φθάσει το 20 %, ενώ του λίπους το 5 %. Ιχνοστοιχεία όπως το κάλιο (K) και το μαγνήσιο (Mg) παρευρίσκονται στο βόειο κρέας, το οποίο υπερτερεί έναντι άλλων ερυθρών κρεάτων σε σίδηρο (Fe) και ψευδάργυρο (Zn). Αυτή η υπεροχή σε σίδηρο οφείλεται στην μεγαλύτερη περιεκτικότητα του βόειου κρέατος σε μυοσφαιρίνη, η οποία το καθιστά ερυθρότερο. Η περιεκτικότητα του σε βιταμίνες του συμπλέγματος B είναι ικανοποιητική και ιδιαίτερα σε βιταμίνη B12 (Γεωργάκης, 2005).

Ένα προϊόν κρέατος με μεγάλη ζήτηση είναι ο κιμάς από βόειο κρέας. Ο κιμάς είναι κρέας το οποίο έχει λεπτοτεμαχισθεί ή έχει περάσει από κρεατομηχανή με ατέρμονα κοχλία. Κατά την επεξεργασία αυτή, αυξάνεται σημαντικά η επιφάνεια του, με αποτέλεσμα τη διασπορά των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο κρέας. Οι συνθήκες αυτές που επικρατούν, ευνοούν το γρήγορο πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών και αυξάνουν ακόμα περισσότερο την επικινδυνότητα του βόειου κιμά για τους καταναλωτές, ιδιαίτερα όταν δεν εφαρμόζονται οι κατάλληλες συνθήκες υγιεινής (Μπλούκας, 2007).

1.3 ΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΣΤΟ ΚΡΕΑΣ

Σύμφωνα με τις σύγχρονες διατροφικές συνήθειες, έχει διαμορφωθεί ένα πλαίσιο δεδομένων για τη διατροφική ασφάλεια. Παρατηρείται ότι η αυξανόμενη πολυπλοκότητα στην αλυσίδα μεταποίησης των τροφίμων έχει δημιουργήσει νέους δυνητικούς κινδύνους καθώς επίσης η εμφάνιση τροφιμογενών ασθενειών μικροβιολογικής αιτίας συνεχίζει να επιμένει παρά τις εξελίξεις στα ελεγκτικά συστήματα. Τις τελευταίες δεκαετίες παρουσιάζεται αύξηση της επικράτησης των ασθενειών που προκαλούνται από μολυσμένα τρόφιμα και ένας τεράστιος αριθμός κρουσμάτων που προκλήθηκαν από ασθένειες όπως σαλμονέλωση, ηπατίτιδα A, μολύνσεις από εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC) κλπ τόσο σε αναπτυσσόμενες όσο και σε αναπτυγμένες χώρες. Σύμφωνα με μελέτες επικινδυνότητας, στις βιομηχανικές χώρες παρουσιάστηκαν μεγάλα ποσοστά

ασθενειών σε ποσοστό 10-15 % του πληθυσμού, με τις ΗΠΑ να αγγίζουν ενδεχομένως και το 25 με 30 % (Mead *et al.*, 1999).

Το κρέας αποτελεί ευνοϊκό υπόστρωμα ανάπτυξης τόσο αλλοιογόνων όσο και παθογόνων μικροοργανισμών. Όσον αφορά τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, στην αρχική μικροχλωρίδα των νωπών σφαγίων οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν είναι τα Gram⁻ ραβδόμορφα βακτήρια και οι μικρόκοκκοι (π.χ *Kocuria* spp. και *Staphylococcus* spp.). Επιπλέον Gram⁻ βακτήρια όπως *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Moraxella* spp. και *Enterobacteriaceae* αλλά και Gram⁺ βακτήρια συμπεριλαμβανομένων αυτών που σχηματίζουν σπόρια, των οξυγαλακτικών και του *Brochothrix thermosphacta* είναι πιθανόν να υπάρχουν στην μικροχλωρίδα του κρέατος. Τέλος μικρό ποσοστό μπορεί να αποτελούν οι ζύμες και οι μύκητες (Paramithiotis *et al.*, 2009). Όσον αφορά τους παθογόνους μικροοργανισμούς, η κατανάλωση του κρέατος και των προϊόντων του έχει οδηγήσει σε ανθρώπινες λοιμώξεις παγκοσμίως. Παθογόνα βακτήρια που θεωρούνται υπεύθυνα είναι το *E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, και *Yersinia enterocolitica*. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί ενδέχεται να παρευρίσκονται στον γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων, τα οποία ζώα προορίζονται για τη διατροφή του ανθρώπου. Τα ζώα τις περισσότερες φορές είναι υγιή, ενδέχεται όμως να υπάρξουν ζώα και να είναι φορείς των παθογόνων. Επομένως μετά τη σφαγή τους, μεταφέρονται στον άνθρωπο μέσα από την παραγωγή, το χειρισμό και την κατανάλωση του κρέατος και των προϊόντων του (Nørgung *et al.*, 2009). Στο βόειο κρέας και κατ' επέκταση στο βόειο κιμά επικρατούν κυρίως τα παθογόνα βακτήρια *Salmonella* και *Escherichia coli* O157:H7 (FSIS, 2002).

Συγκεκριμένα, ο παθογόνος μικροοργανισμός *E. coli* O157:H7 αναγνωρίστηκε ως παθογόνο που προσβάλλει τα τρόφιμα στα μέσα του 1980 όταν ένα κρούσμα από μολυσμένα μπιφτέκια προκάλεσε μια ασυνήθιστη γαστρεντερική νόσο στις Ηνωμένες Πολιτείες (Riley *et al.*, 1983). Ο βόειος κιμάς είναι το πιο συχνά εμπλεκόμενο τρόφιμο που οφείλεται σε λοιμώξεις από *E. coli* O157:H7 και από STEC (Food Safety Authority of Ireland 2010, Kaspar *et al.*, 2010, Rhoades *et al.*, 2009, Valadez *et al.*, 2011). Θεωρείται ένας από τους πιο μελετημένους παθογόνους μικροοργανισμούς λόγω των πολλαπλών κρουσμάτων μετά την κατανάλωση μολυσμένων μπιφτεκιών με *E. coli* O157:H7 καθώς επίσης και της σοβαρότητας των ασθενειών που έχει προκαλέσει.

1.4 Ο ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ *Escherichia coli*

1.4.1 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

Η επιστημονική προσέγγιση έχει εστιάσει στον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* σε τέτοιο βαθμό έτσι ώστε σήμερα να θεωρείται ένας από τους πιο μελετημένους. Ο μικροοργανισμός *E. coli* απομονώθηκε αρχικά το 1885 από παιδικά περιττώματα. Αποτελεί μικροχλωρίδα του εντερικού σωλήνα τόσο των ανθρώπων όσο και των θερμόαιμων ζώων και παρά το γεγονός ότι η συμβίωση αυτή είναι γενικά αβλαβής έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει διάφορες μολύνσεις όπως Gram αρνητική σηψαιμία, πνευμονία σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και μηνιγγίτιδα σε νεογνά.

Τα στελέχη του *E. coli* αναγνωρίστηκαν αρχικά ως αίτια γαστρεντερίτιδας στα νήπια της Αγγλίας το 1940 και τα στελέχη που οφείλονται για τη διάρροια ταξινομήθηκαν το 1982 σε τρεις τύπους βασισμένους στην ικανότητα τους για πρόκληση ασθενειών:

- ❖ Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (enteropathogenic *E. coli* – EPEC)
- ❖ Εντεροεισβολικά στελέχη *E. coli* (enteroinvasive *E. coli* – EIEC)
- ❖ Εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli* (enterotoxigenic *E. coli* – ETEC)

Όσον αφορά αυτές τις τρεις ομάδες, δεν αποτελούν συχνές αιτίες ασθενειών μέσω των τροφίμων στις αναπτυγμένες χώρες. Στις αναπτυσσόμενες χώρες όμως, θεωρείται ότι αποτελούν αιτία παιδικής διάρροιας.

Επιπλέον άλλοι δύο τύποι του βακτηρίου *E. coli* που αναγνωρίστηκαν πρωτίστως στα παιδιά και δρουν μέσω προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου είναι οι ακόλουθοι:

- ❖ Εντεροσυγκεντρωτικά στελέχη *E. coli* (enteroaggregative *E. coli* – EaggEC)
- ❖ Διαχυτά προσκολλημένα στελέχη *E. coli* (diffusely adherent *E. coli* – DAEC)
(Nataro JP *et al.*, 1998)

Η εμφάνιση αυτών των ορότυπων του *E. coli* απεικονίζει μία μεγάλη άνεση του γονιδιώματος του μικροοργανισμού. Η απόκτηση, η απώλεια ή η αναδιοργάνωση των γενετικών στοιχείων, εισάγουν νέα χαρακτηριστικά παθογένειας και ικανότητας για προσβολή.

Άλλη μία ομάδα που αναγνωρίστηκε και έχει ανησυχήσει ιδιαίτερα λόγω των πολλαπλών κρουσμάτων στα οποία έχει εμπλακεί είναι:

- ❖ Εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (enterohemorrhagic *E. coli* – EHEC)

Τα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* έχουν προκαλέσει σοβαρά κρούσματα με επίπτωση ασθενειών και μπορεί να επιφέρουν ακόμα και τον θάνατο. Ο όρος EHEC αναφέρεται σε ορότυπους του *E. coli* που μοιράζονται τα ίδια κλινικά, παθογόνα και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά με το *E. coli* O157:H7. Το *E. coli* O157:H7 θεωρείται ο ορότυπος που είναι υπεύθυνος για το υψηλότερο ποσοστό περιπτώσεων ασθένειας.

1.4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

Το βακτήριο *E. coli* ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Τα κύτταρα του είναι Gram⁻, μεσόφιλα με ανάπτυξη μεταξύ των 10 - 50 °C και με άριστη τους 30 - 37 °C. Τα κύτταρα του έχουν μήκος περίπου 2 μικρόμετρα (μm) με 0.5 μm διάμετρο και όγκο 0.6 – 0.7 μm³. Είναι προαιρετικά αναερόβια, μη σποριογόνα, ραβδόμορφα, θετικά στην καταλάση και αρνητικά στην οξειδάση. Παρουσιάζουν δυνατότητα κίνησης η οποία υποβοηθείται από περίτριχα μαστίγια που διαθέτουν γύρω από το κύριο σώμα του βακίλλου. Μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε μία πληθώρα υποστρωμάτων. Το *E. coli* παρουσιάζει ζύμωση μεικτών οξέων (παραγωγή γαλακτικού, οξικού, ηλεκτρικού οξέος, αιθανόλης και αερίων CO₂ και H₂). Είναι ευαίσθητο σε ήπιες μορφές θερμικής μεταχείρισης όπως είναι η παστερίωση. Ο μικροοργανισμός μπορεί να επιζήσει υπό κατάψυξη για εκτεταμένες περιόδους. Το

βέλτιστο pH ανάπτυξης του είναι κοντά στο ουδέτερο και μπορεί να πραγματοποιηθεί αύξηση του μικροοργανισμού ακόμα και σε pH 4.4. Όσον αφορά την ενεργότητα ύδατος (a_w), η ελάχιστη τιμή που απαιτείται για την αύξηση του είναι η τιμή 0.95 (Kubitscek, 1990).



Εικόνα 1.4.2.1 Χαρακτηριστική μορφολογία κυττάρων *E. coli*. Παρατήρηση σε κοινό οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου μετά από χρώση Gram.

Το *E. coli* αποτελεί μικροχλωρίδα του εντερικού σωλήνα των ανθρώπων, των θερμόαιμων ζώων και των πτηνών. Λόγω της παρουσίας του σε πληθυσμό 10^6 κύτταρα / g περιεχομένου του παχέος εντέρου, αποτελεί δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης λόγω της παρουσίας του σε περιττώματα, της επιβίωσης του στο νερό και του μη παθογενούς χαρακτήρα του. Οι άνθρωποι φορείς παθογόνων στελεχών μπορεί να αποβάλλουν τους μικροοργανισμούς μέσω των κοπράνων δίχως να παρουσιάζουν συμπτώματα. Πολλά ζώα συμπεριλαμβανομένων και των οικόσιτων μπορούν επίσης να φέρουν διαφορετικούς παθογόνους ορότυπους και να μολύνουν το έδαφος, το νερό και τα τρόφιμα. Σύμφωνα με τα στελέχη του *E. coli* που έχουν απομονωθεί, η παθογόνος ομάδα ETEC μπορεί να βρεθεί στους ανθρώπους, στα γουρούνια, στα πρόβατα, στις κατσίκες, στα άλογα και στα βοοειδή, η EPEC βρίσκεται εξίσου στους ανθρώπους, στα κουνέλια, στους σκύλους, στις γάτες και στα άλογα, η EIEC και EAggEC βρίσκονται μόνο στους ανθρώπους και η EHEC βρίσκεται στους

ανθρώπους, στα βοοειδή και στις κατσίκες (Fratamico *et al.*, 2002). Τη δεκαετία του '40, προτάθηκε από τον Kauffman ένα σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο για το *E. coli* το οποίο βασιζόταν στο σωματικό λιποπολυσακχαρίτη Ο, μαστίγιο Η και πολυσακχαρίτη καψιδίου αντιγόνου Κ. Στις μέρες μας εφαρμόζεται το σύστημα Ο:Η σύμφωνα με το οποίο οι κύριες οροομάδες καθορίζονται από τα αντιγόνα Ο και υποδιαιρούνται έπειτα σε ορότυπους βάσει των αντιγόνων Η. Έτσι τα διάφορα στελέχη του *E. coli* τείνουν να εμπίπτουν σε κάποιον από τους ορότυπους Ο:Η, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται τόσο η ταυτοποίηση και η ανίχνευση των παθογόνων όσο και οι διάφορες επιδημιολογικές έρευνες.

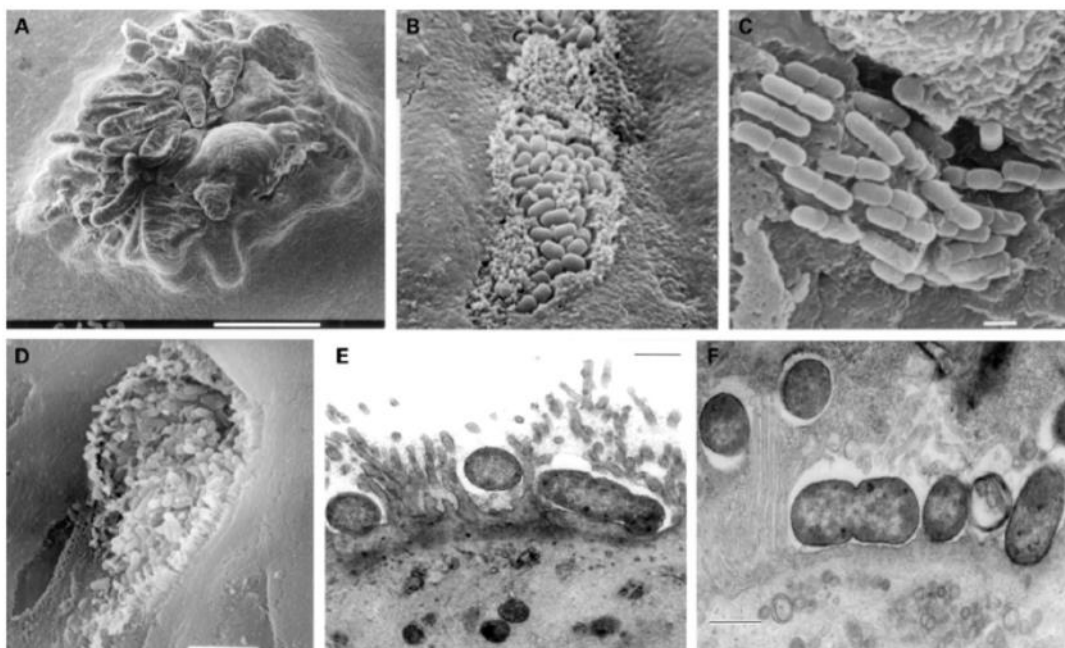
1.4.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ & ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Όπως προαναφέρθηκε, τα παθογόνα στελέχη *E. coli* ανήκουν σε 6 παθογόνες ομάδες (EPEC, EIEC, ETEC, EHEC EaggEC, EAEC), βάση της ικανότητας τους να παράγουν τοξίνες, να προσκολλώνται και να εισβάλλουν στα επιθηλιακά κύτταρα. Οι κύριες κατηγορίες διαρροϊκών στελεχών βάσει της λοιμωξιολογίας τους είναι οι 4 ακόλουθες:

1.4.3.1 ΕΝΤΕΡΟΑΙΜΟΡΑΓΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (EHEC)

Η ομάδα EHEC περιγράφηκε αρχικά στον Καναδά όπου σε ορισμένες περιοχές συναγωνίζεται τα βακτήρια *Campylobacter* spp και *Salmonella* spp ως η πιο συχνή αιτία διαρροϊκών συμπτωμάτων. Κύρια ορολογική ομάδα αποτελεί η O157:H7. Άλλες EHEC ορολογικές ομάδες αποτελούν οι O157:NM, O55, O26, O113 και O117. Τα στελέχη EHEC έχουν τραβήξει την προσοχή λόγω της σοβαρότητας των ασθενειών που προκαλούν. Μπορεί να κυμανθούν από μη αιμορραγική διάρροια έως

το απειλητικό για τη ζωή αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο με θνησιμότητα 5-15 % (hemolytic uraemic syndrome, HUS) και την θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) (Greatorex and Thorne, 1994).

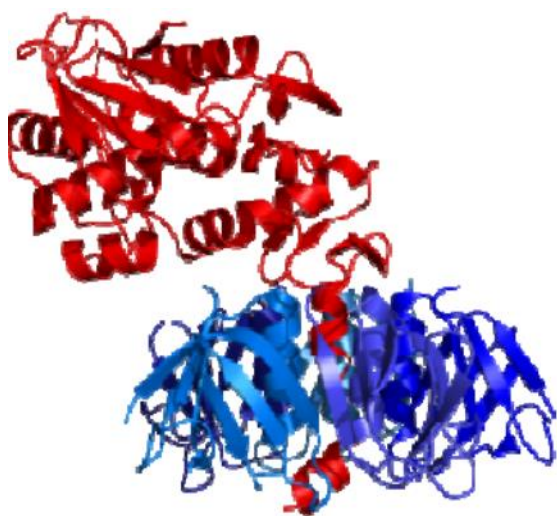


Εικόνα 1.4.3.1.1 Εντεροαιμορραγικά στελέχη EHEC

1.4.3.1.1 ΤΟΞΙΝΕΣ VT / STX

Τα στελέχη *E. coli* O157:H7 παράγουν τις βεροτοξίνες (verocytotoxins, VT) ή τις σιγκατοξίνες (Shiga-like toxins, Stx). Οι τοξίνες αυτές αναφέρονται συχνά και ως VTEC ή STEC. Όσον αφορά τις βεροτοξίνες, οι μελέτες έχουν αποκαλύψει την παρουσία τουλάχιστον δύο τοξινών των VT I και VT II, που λόγω της ομοιότητάς τους με την τοξίνη Shiga, έχουν ονομαστεί επίσης τοξίνες Shiga, SLTI και SLTII. Όσον αφορά τις σιγκατοξίνες, υπάρχουν 2 ξεχωριστές Stx: Η Stx1 και Stx2. Η Stx1 είναι μία ιδιαίτερα σημαντική τοξίνη ενώ η Stx2 εμφανίζει παραλλαγές. Παραδείγματα

αποτελούν οι Stx2c, Stx2v, Stx2hb και Stx2e. Ένα στέλεχος μπορεί να εκφράσει είτε την Stx1 μόνο, είτε την Stx2 μόνο και τις δύο μαζί ή ακόμα και κάποιες παραλλαγές της Stx2. Οι τοξίνες Stx δεσμεύονται σε έναν ειδικό γλυκολιπιδιακό υποδοχέα που εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των εντέρων και των νεφρών. Οι τοξίνες εμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 1.4.3.1.1.1 Δομή Stx2 από το *E. coli* O157:H7

1.4.3.1.2 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΕΗΕC (VTEC, STEC)

Οι τοξίνες καταστρέφουν τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου και οδηγούν σε αιμορραγική κολίτιδα. Στα συμπτώματα της αιμορραγικής κολίτιδας περιλαμβάνονται οι κοιλιακοί πόνοι, η διάρροια συνήθως με αίμα και ο εμετός. Τα συμπτώματα εμφανίζονται 3 - 9 ημέρες μετά την κατανάλωση του επιμολυσμένου τροφίμου. Συνήθως διαρκούν 4 - 10 ημέρες και υποχωρούν από μόνα τους με τη πάροδο του χρόνου. Η αιμορραγική κολίτιδα διακρίνεται από την τυπική κολίτιδα από την έλλειψη πυρετού και την απουσία λευκοκυττάρων στον εμετό. Έχει

επιπτώσεις κυρίως στους ενήλικους και ιδιαίτερα στους ηλικιωμένους με μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης τους καλοκαιρινούς μήνες.

Επιπλέον προκαλείται βλάβη στα νεφρά και τον εγκέφαλο. Η βλάβη στα νεφρά οδηγεί στο αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (hemolytic uraemic syndrome, HUS). Το HUS αποτελείται από την οξεία νεφρική ανεπάρκεια, την αιμολυτική αναιμία και τη θρομβοκυτοπενία. Εμφανίζεται πιο συχνά στα παιδιά όπου είναι η κύρια αιτία της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας. Κρούσματα έχουν καταγραφεί στη Δυτική Ευρώπη και στην Βόρεια Αμερική. Στις 70 περιπτώσεις των κρουσμάτων στο Λονδίνο μεταξύ του 1980 και 1986, το 6 – 13 % αποτέλεσε ποσοστό των μοιραίων περιστατικών σε άτομα που εμφάνιζαν μακροχρόνια νεφρική βλάβη. Όσον αφορά τη βλάβη στον εγκέφαλο, η βλάβη αυτή οδηγεί σε μία γενικευμένη μορφή πολυοργανικής διαταραχής που καλείται θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP). Η TTP είναι μία λιγότερο κοινή επιπλοκή που περιορίζεται κατά πολύ στους ενήλικους. Συσχετίζεται με το HUS αλλά προκαλεί μικρότερη βλάβη στους νεφρούς σε σχέση με αυτό. Περιλαμβάνει τον πυρετό και νευρολογικά συμπτώματα ως αποτέλεσμα των θρόμβων του αίματος στον εγκέφαλο. Οι δύο αυτές ασθένειες μπορεί να είναι θανάσιμες. Ομάδες κινδύνου αποτελούν όλοι οι άνθρωποι έχοντας την ίδια ευαισθησία στις ασθένειες αυτές, με τα μικρά παιδιά και τους ηλικιωμένους να εμφανίζουν συχνότερα τα πιο σοβαρά συμπτώματα.

1.4.3.2 ΕΝΤΕΡΟΠΑΘΟΓΟΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (EPEC)

Τα εντεροπαθογόνα στελέχη έχουν συνδεθεί με τη νηπιακή διάρροια. Στα νήπια η ασθένεια είναι πιο σοβαρή από πολλές άλλες διαρροϊκές επιμολύνσεις και μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από δύο εβδομάδες. Στα κύρια συμπτώματα συγκαταλέγονται η γαστρεντερίτιδα, η υδατώδη διάρροια, ο εμετός και ο πυρετός. Για την παρουσίαση συμπτωμάτων είναι απαραίτητη η κατανάλωση 10^{6-9} κυττάρων μεταξύ 12 - 36 ωρών μετά την κατάποση.

Τα παθογόνα αυτά δεν παράγουν καμία τοξίνη, αλλά προσκολλώνται ισχυρά στα επιθηλιακά κύτταρα με τη βοήθεια του “bundle-forming pili” (bfp) και ενός άλλου παράγοντα μολυσματικότητας που ονομάζεται “attachment-effacement factor” (EAF). Η ισχυρή προσκόλληση προκαλεί σοβαρή βλάβη στο επιθηλιακό στρώμα που παρεμβαίνει στους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος των ξενιστικών κυττάρων, οδηγώντας σε λανθασμένη αναρρόφηση των θρεπτικών στοιχείων και στη διάρροια.

1.4.3.3 ΕΝΤΕΡΟΕΙΣΒΟΛΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (EIEC)

Η μόλυνση από στελέχη EIEC οδηγεί στα κλασσικά συμπτώματα μια βακτηριακής δυσεντερίας όπως αυτή που προκαλείται από τη *Shigella* (Day *et al.*, 1981). Τόσο η *Shigella* όσο και τα EIEC προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα, στη συνέχεια διεισδύουν και μετακινούνται από κύτταρο σε κύτταρο διαδίδοντας έτσι τη λοίμωξη στα έντερα. Τα υπεύθυνα γονίδια για την εισβολή στα επιθηλιακά κύτταρα βρίσκονται σε ένα πλασμίδιο μεγέθους 220 kb (virulence - associated invasion plasmid). Το πλασμίδιο αυτό είναι επίσης παρόν στη *Shigella*. Τα κλινικά γνωρίσματα είναι ο πυρετός, η δυσφορία, οι κοιλιακοί πόνοι και η υδατώδη διάρροια. Η μολυσματική δόση για τα στελέχη EIEC είναι υψηλότερη από αυτή της *Shigella*.

1.4.3.4 ΕΝΤΕΡΟΤΟΞΙΓΕΝΗ ΣΤΕΛΕΧΗ (ETEC)

Μετά την προσκόλληση στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, τα στελέχη ETEC, παράγουν μία θερμοσταθερή (ST) τοξίνη που μπορεί να αντέξει την θέρμανση στους 100 °C για 15 λεπτά καθώς και την παρουσία οξέων ή μία θερμοασταθή (LT) τοξίνη που αδρανοποιείται σε θερμοκρασίες της τάξεως των 60 °C για 30 λεπτά και σε χαμηλό pH ή και τις δύο. Όσον αφορά την θερμοασταθή τοξίνη LTI, φέρει μία

ισχυρή ομοιότητα με αυτή της χολέρας και αποτελείται από πέντε υπομονάδες B με μοριακό βάρος 11.5 kDa (Clemens *et al.*, 1988) που είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση της τοξίνης στα επιθηλιακά κύτταρα και μία υπομονάδα A με μοριακό βάρος 25 kDa που μεταφέρεται στα επιθηλιακά κύτταρα όπου και ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (Tauschek *et al.*, 2002). Οι εντεροτοξίνες αυτές παρεμβάλλονται στην κυτταρική πρωτεϊνοσύνθεση, αυξάνουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης και προκαλούν παρεμπόδιση της απορρόφησης ιόντων νατρίου και διέγερση της έκκρισης ιόντων χλωρίου από τα επιθηλιακά κύτταρα, κάτι που οδηγεί σε υδατώδη διάρροια. Οι εντεροτοξίνες δεν προκαλούν ιστολογικές αλλαγές στο βλεννογόνο υμένα των κυττάρων, συνέπεια τούτου να μην παρατηρείται εμφανής φλεγμονή στο έντερο.

Η ασθένεια που προκαλείται από τα στελέχη ETEC εμφανίζεται συνήθως μεταξύ 12 - 36 ωρών μετά την κατάποση. Τα συμπτώματα κυμαίνονται μεταξύ ήπιων όπως είναι η διάρροια χωρίς πυρετό, έως και μιας οξείας αντίδρασης όπως αυτές που εμφανίζονται στην περίπτωση της χολέρας. Συνήθως η ασθένεια περιορίζεται από μόνη της μετά την παρέλευση του χρονικού διαστήματος της τάξεως των 2 - 3 ημερών. Στις αναπτυσσόμενες χώρες αποτελεί αιτία παιδικής διάρροιας όπου μπορεί να προκαλέσει ακόμα και σοβαρή αφυδάτωση.

1.4.3.5 ΕΝΤΕΡΟΑΘΡΟΙΣΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ (EAEC)

Αποτελεί ξεχωριστή κατηγορία και το όνομα της προκύπτει από τον χαρακτηριστικό τρόπο προσκόλλησης των κολοβακτηριδίων αυτών στα κύτταρα της ιστοκαλλιέργειας Hep-2 *in vitro*. Τα στελέχη αυτά σχηματίζουν αθροίσματα που προσκολλώνται τόσο πάνω στα κύτταρα όσο και στα κενά μεταξύ τους (Nataro, 1987). Όσον αφορά την παθογένεια, τα στελέχη αυτά έχουν επιφέρει ιστοπαθολογικές αλλαγές στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου τόσο ασθενών όσο και πειραματόζωων (Hicks *et al.*, 1996). Οι αλλαγές που προκλήθηκαν κατά τη διάρκεια της μόλυνσης συνδέθηκαν με την παραγωγή μιας κυτταροτοξίνης. Με βάση αυτήν προσδιορίστηκαν δύο πρωτεΐνες

μεγάλου μοριακού βάρους οι οποίες όταν εισήχθησαν στο κυκλοφοριακό σύστημα αρουραίων προκάλεσαν αιμορραγικές και νεκρωτικές αλλαγές (Eslava *et al.*, 1993). Παράδειγμα αυτών των πρωτεϊνών αποτελεί η πρωτεΐνη Pet (plasmid-encoded toxin) η οποία κωδικοποιείται από το πλασμίδιο pAA μοριακού βάρους 65 Mda. Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι προκαλούν φαινόμενα αποσταθεροποίησης των κυττάρων Hep-2 και HT29 C1 στις αντίστοιχες καλλιέργειες λόγω στρογγυλοποίησης και συστολής του κυτταροσκελετού με αποτέλεσμα να μην υπάρχει δυνατότητα παραμονής του στον ιστό (Navaro-Garcia *et al.*, 1999).

1.5 ΚΡΟΥΣΜΑΤΑ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΛΟΓΩ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *E. coli* O157:H7

Τις τελευταίες δεκαετίες υπάρχουν πολλά καταγεγραμμένα κρούσματα. Η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης τόσο του *E. coli* O157:H7 όσο και των STEC από τη δεκαετία του 1990 σχετίζεται με την αύξηση της κατανάλωσης του βόειου κιμά (Mead *et al.*, 1999). Πιο συγκεκριμένα, καταγεγραμμένα κρούσματα από *E. coli* O157:H7 σε μπιφτέκια από βόειο κιμά έχουν εκτιμηθεί στη Νότια Αμερική με πληθυσμιακή ομάδα τους ενήλικες και τα παιδιά (Cassin *et al.*, 1998), στην Αυστραλία (Lammerding *et al.*, 1999) και στις Ηνωμένες Πολιτείες εξίσου στις ίδιες πληθυσμιακές ομάδες (USDA-FSIS, 2001, Ebel *et al.*, 2004). Στη συνέχεια παρατίθεται πίνακας (Πίνακας 1.5.1) που αναφέρει κρούσματα από την κατανάλωση μολυσμένου βόειου κρέατος και των προϊόντων του το χρονικό διάστημα 2007 - 2013.

Πίνακας 1.5.1 Καταγεγραμμένα κρούσματα από VTEC το διάστημα 2007 έως το 2013 που συνδέονται με την κατανάλωση του βόειου κρέατος και των προϊόντων του (Geraldine Duffy *et al.*, 2014)

Country	Serogroup	Year	Number of illnesses (reported deaths)	Vehicle of transmission	Reference
Denmark	O157	2012	9	Ground beef	Soborg, Muller, Lassen, Ethelberg, and Molbak (2012)
Netherlands	O157	2011	3	Filet Americain	EFSA (2013b)
UK	O157	2011	4	Beef curry	EFSA (2013b)
Japan	O111	2011	181 (5)	Yukhoe (raw beef dish)	National Institute of Infectious Diseases, Japan (2012)
USA	O26	2010	3	Ground beef	USDA-FSIS (2012)
USA	O157	2010	21	Blade tenderised steak	CDC (2010a)
France	O123	2009	2	Ground beef	King et al. (2010)
USA	O157	2009	26 (2)	Ground beef	CDC (2009a)
USA	O157	2009	23	Ground beef	CDC (2009b)
Netherlands	O157	2008-2009	20	Steak tartare	Greenland et al. (2009)
Belgium	Not reported	2008	6	Raw minced beef	EFSA (2013b)
USA	O157	2008	49	Ground beef	CDC (2008)
USA	O157	2008	99	Beef cuts	CDC (2010b)
Denmark	O26	2007	18	Beef sausage	Ethelberg et al. (2007)
USA	O157	2007	40	Ground beef patties	CDC (2007)

1.5.1 ΟΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ *E. coli* O157:H7 ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΚΡΕΑΤΟΣ

Η παρουσία του *E. coli* O157:H7 τόσο στις ζωοτροφές όσο και στα περιττώματα των ζώων θεωρείται ύψιστης σημασίας και αποτελεί πρόκληση στους παραγωγούς των βοοειδών καθώς επίσης και στις εγκαταστάσεις μεταποίησης του κρέατος. Είναι αναπόφευκτο κάτω από αυτές τις συνθήκες να μην υπάρξει διασταυρούμενη μόλυνση. Από το 1998 μέχρι το Μάιο του 2008, ο αριθμός των κρουσμάτων από *E. coli* O157:H7 που προκλήθηκε λόγω της κατανάλωσης επιμολυσμένων προϊόντων με βάση το κρέας, αντικατοπτρίζει αλλαγές τόσο στην επεξεργασία του κρέατος όσο και στην αύξηση του ελέγχου της ασφάλειας των προϊόντων στις εγκαταστάσεις μεταποίησης. Από το 2000 μέχρι το 2002 υπήρξε ένα υψηλότερο ποσοστό από

ανακλήσεις σε προϊόντα κρέατος τα οποία είχαν επιμολυνθεί από *E. coli* O157:H7 στις Ηνωμένες Πολιτείες. Επίσης στη διάρκεια αυτής της περιόδου ένα άλλο ποσοστό ανακλήσεων μικρότερο από το προαναφερθέν σημειώθηκε σε παντοπωλεία.

Τον Οκτώβριο του 2002, το FSIS (Food Safety and Inspection Service) βασιζόμενο στην απόδειξη ότι το *E. coli* O157:H7 είναι υπεύθυνο για πρόκληση ασθενειών μετά την κατανάλωση μολυσμένου βόειου κιμά, ζήτησε να γίνει λεπτομερής έλεγχος σχετικά με την ασφάλεια των προϊόντων από βόειο κιμά όπως μπιφτέκια και να εφαρμοστούν τα κατάλληλα μέτρα τόσο για την πρόληψη όσο και την εξάλειψη σε όλους τους χώρους παρασκευής και μεταποίησης των μπιφτεκιών (Food Safety and Inspection Service, 2002). Στις αρχές του Ιανουαρίου το 2003, το Beef Industry Food Safety Council πήρε εκπροσώπους από όλους τους τομείς της βιομηχανίας του βόειου κρέατος οι οποίοι επιμελώς εργάστηκαν από κοινού με σκοπό τη δημιουργία εγγράφων με βέλτιστες πρακτικές που θα χρησίμευαν ως πρότυπο για την μεταποίηση του βόειου κρέατος σε ένα ακόμη ασφαλέστερο προϊόν. Τα έγγραφα αυτά είναι διαθέσιμα σε όλους τους παραγωγούς ζώων, στις εγκαταστάσεις σφαγής και στα καταστήματα λιανικής πώλησης. Πραγματοποιείται ενημέρωση αυτών σε τακτά χρονικά διαστήματα με τα νεότερα ευρήματα των ερευνών (Beef Industry Food Safety Council, 2008). Ως απόρροια αυτών των ενεργειών, το 2003 το USDA (U.S. Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service) δημοσίευσε στοιχεία που δείχνουν μια πτώση του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 σε θετικά δείγματα από βόειο κρέας συγκριτικά με τα προηγούμενα έτη (Food Safety and Inspection Service, 2002).

Το 2007 άλλο ένα περιστατικό ανάκλησης συνέβη στις Ηνωμένες Πολιτείες. Τον Οκτώβριο του ίδιου έτους έλαβε χώρα η δεύτερη μεγαλύτερη ανάκληση κρέατος η οποία προκάλεσε ζημιά της τάξεως των 21.7 εκατομμυρίων δολαρίων. Επιπλέον, 40 περιπτώσεις επιμόλυνσης με *E. coli* O157:H7 έχουν ταυτιστεί με τα μοτίβα PFGE τα οποία αντιστοιχούν σε τουλάχιστον ένα από τα μοτίβα των στελεχών *E. coli* που βρέθηκαν σε κατεψυγμένα μπιφτέκια από βόειο κρέας που έφεραν τη μάρκα Torp's. Δύο ασθενείς ανέπτυξαν το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS). Σε καμία από αυτές τις δύο περιπτώσεις δεν αναφέρθηκε θάνατος (Food Safety and Inspection Service, 2007a). Η ανάκληση αυτή προκάλεσε ανησυχία σε πάνω από 30 διαφορετικά προϊόντα από βόειο κρέας διαφόρων εταιριών τα οποία διανέμονταν στις Ηνωμένες Πολιτείες (Food Safety and Inspection Service, 2007b). Το USDA ανακοίνωσε στις 3

Νοεμβρίου του 2007 ότι οι βιομηχανίες τροφίμων όπως Cargill Meat Solutions Corporation και Wyalusing Pennsylvania πραγματοποίησαν εθελοντική ανάκληση των προϊόντων τους στο ενδεχόμενο ότι αυτά έχουν επιμολυνθεί με *E. coli* O157:H7 (Food Safety and Inspection Service, 2007b).

Άμεσα το FSIS ανταποκρίθηκε σε αυτές τις ανακλήσεις ερευνώντας τις πρακτικές ορθής βιομηχανικής πρακτικής που τηρούσαν οι συγκεκριμένες βιομηχανίες. Έξι μήνες μετά την ανάκληση, η βιομηχανία Torpp's Meat Company, έπειτα από 67 χρόνια στο χώρο των τροφίμων, έκλεισε. Η κατάληξη αυτή ήταν αναμενόμενη μετά από αυτό το γεγονός λόγω της τεράστιας ζημιάς που προκλήθηκε. Επιπλέον η Hudson Foods Co. έκλεισε τη βιομηχανία της στην Κολομβία έπειτα από μία ανάκληση το 1997 στις Ηνωμένες Πολιτείες που πραγματοποιήθηκε σε χάμπουργκερ από βόειο κρέας επιμολυσμένα με *E. coli*. Η ανάκληση αυτή οδήγησε σε συνολικό κόστος τα 25 εκατομμύρια δολάρια. Έπειτα η συγκεκριμένη βιομηχανία ξανάνοιξε με διαφορετικούς υπεύθυνους (Associated Press, 2007).

Αναμφίβολα τα μπιφτέκια από βόειο κρέας αποτελούν ένα προϊόν με μεγάλη ζήτηση. Λόγω των πολλαπλών κρουσμάτων από *E. coli* O157:H7, μεγάλο μέρος της έρευνας έχει στραφεί στον τρόπο εξάλειψης αυτού του παθογόνου. Το σύστημα διαχείρισης της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων (HACCP) καθώς και άλλα προγράμματα (π.χ ServSafe) σε συνδυασμό με το USDA έχουν ως στόχο την διαβεβαίωση των καταναλωτών ότι οι βιομηχανίες βόειου κρέατος παράγουν και διαθέτουν στην αγορά προϊόντα απαλλαγμένα από οποιαδήποτε πηγή μόλυνσης. Επιπλέον το FSIS συνεχίζει να πραγματοποιεί ελέγχους και ανακλήσεις καθώς επίσης και να κάνει έρευνες σε συνεργασία με πανεπιστήμια με σκοπό την διασφάλιση της τήρησης της ορθής βιομηχανικής πρακτικής.

1.6 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ *E. coli* O157:H7 ΣΕ ΜΠΙΦΤΕΚΙΑ ΑΠΟ ΒΟΕΙΟ ΚΙΜΑ

Όταν ένα προϊόν είναι αλεσμένο ή κομμένο σε φέτες, τα παθογόνα μπορεί να εισχωρήσουν και να διαδοθούν μέσα στο κρέας (Loneragan, 2005). Τα αλεσμένα προϊόντα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα έκθεσης στο *E. coli* O157:H7 σε σχέση με τα άθικτα προϊόντα. Αυτό συμβαίνει κατά την μεταποίηση του κρέατος που πραγματοποιείται σε μηχάνημα καθώς επίσης έρχεται και σε επαφή με το προσωπικό που χειρίζεται τον εξοπλισμό. Τα αλεσμένα προϊόντα πρέπει να τεμαχίζονται και ο τεμαχισμός τους γίνεται κατά κύριο λόγο με το χέρι και έπειτα πραγματοποιείται η άλεση στη μηχανή του κιμά. Ο εξοπλισμός, τα τραπέζια και οι χειρισμοί του προσωπικού αυξάνουν την έκθεση του κρέατος στο *E. coli* O157:H7. Παράλληλα με τα μέτρα που λαμβάνουν οι βιομηχανίες τροφίμων, οι καταναλωτές καλούνται να προφυλάξουν την υγεία τους από μεριά τους με τους σωστούς χειρισμούς όπως είναι η κατάλληλη θερμική επεξεργασία των προϊόντων και η αποφυγή της διασταυρούμενης μόλυνσης.

Υπάρχουν αρκετές πηγές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά του *E. coli* O157:H7 είτε πάνω είτε εντός των προϊόντων κρέατος. Τα περιττώματα από τα ζώα μπορούν να μεταφερθούν τόσο στο δέρμα όσο και στο σφάγιο, ο εξοπλισμός μπορεί να επιμολυνθεί, το προσωπικό ενδέχεται να μη χρησιμοποιεί κατάλληλες συνθήκες υγιεινής, η αερομεταφερόμενη επιμόλυνση μπορεί να λάβει χώρα, τα τροκτικά, τα έντομα και άλλα ζώα θεωρούνται πιθανοί κίνδυνοι.

Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 355 βοοειδή στις Ηνωμένες Πολιτείες, καταγράφηκε η παρουσία θετικών δειγμάτων με *E. coli* O157:H7 σε ποσοστό 17 % και μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των κοπράνων και του δέρματος με την επιμόλυνση του σφάγιου (Elder *et al.*, 2000). Οι βιομηχανικές πρακτικές υγιεινής στις εγκαταστάσεις των σφαγίων μπορεί να επηρεάσουν την παρουσία του *E. coli* O157:H7 τόσο στα σφάγια όσο και στο περιβάλλον. Σύμφωνα με έρευνα, σε εγκαταστάσεις σφαγής πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε διάφορα σημεία του σώματος των ζώων όπως στο στήθος, στα πλευρά και στις πίσω επιφάνειες του. Η έρευνα έδειξε ότι το 39 % από τις 27 εγκαταστάσεις σφαγής, είχαν ανεπαρκής πρακτικές υγιεινής ως αποτέλεσμα το 50 % των σφαγίων να είχαν ορατή επιμόλυνση στα περιττώματά τους (Heuvelink *et al.*, 2001).

Ο εξοπλισμός αποτελεί επίσης πηγή για τη μεταφορά των βακτηρίων από επιφάνειες σε προϊόντα κρέατος. Τα παθογόνα βακτήρια που μεταφέρονται από τις επιφάνειες στα διάφορα τρόφιμα μπορούν να επηρεαστούν από διάφορους παράγοντες. Η *Salmonella* Typhimurium και το *Campylobacter jejuni* έδειξαν μία ικανότητα να μεταφέρονται από επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα στο μαρούλι μετά από το χρονικό διάστημα των 10 λεπτών (Moore *et al.*, 2003). Επιπλέον η *S. Typhimurium* μπορεί να μεταφερθεί αμέσως με την επαφή και να επιβιώσει 4 εβδομάδες σε στεγνή επιφάνεια διατηρώντας αρκετά μεγάλο πληθυσμό για τη μεταφορά στα τρόφιμα (Dawson *et al.*, 2007). Ο *Streptococcus pyogenes* προσκολλάται απευθείας σε διάφορα πλαστικά, κεραμικά και σκεύη από ανοξείδωτο χάλυβα (Ingham *et al.*, 2006). Παρόλο που οι συγκεκριμένες μελέτες αναφέρονται σε διαφορετικούς μικροοργανισμούς από το *E. coli* O157:H7, αποτελούν ένδειξη ότι ο εξοπλισμός αποτελεί πηγή διασταυρούμενης μόλυνσης εξαιτίας της προσκόλλησης.

Το προσωπικό μπορεί επίσης να αποτελεί πηγή για τη μεταφορά του *E. coli* O157:H7 σε προϊόντα με βάση το κρέας. Όταν δεν τηρούνται οι κανόνες ορθής βιομηχανικής πρακτικής, όπως για παράδειγμα η αλλαγή γαντιών όταν αυτό κρίνεται απαραίτητο, τότε το *E. coli* O157:H7 μπορεί να μεταφερθεί είτε από τα αποχωρητήρια όταν οι εργαζόμενοι τα επισκέπτονται και δεν πλένουν τα χέρια τους ή από μη μαγειρεμένα προϊόντα κρέατος σε μαγειρεμένα μέσω διασταυρούμενης μόλυνσης με τη χρήση κοινού μαχαιριού. Τα συστήματα διαχείρισης της ασφάλειας στοχεύουν στη μείωση της πιθανής παρουσίας της διασταυρούμενης μόλυνσης και πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί με βάση το σκοπό αυτό. Το 2002 δόθηκε στους χειριστές τροφίμων μία έρευνα με σκοπό να εκτιμηθούν και να καταγραφούν οι συνήθειες τους εν ώρα εργασίας σχετικά με το κατά πόσο τηρούν τους κανόνες ορθής βιομηχανικής πρακτικής. Από τους 127 συμμετάσχοντες στην έρευνα αυτή, το 63 % δήλωσε ότι δεν τηρεί πάντα την ασφάλεια στα τρόφιμα λόγω έλλειψης χρόνου και προσωπικού. Ο κίνδυνος που ενέχεται από τον κακό χειρισμό του προσωπικού είναι αναπόφευκτος και προβληματίζει όλες τις βιομηχανίες τροφίμων. Μπορεί όμως να συντελέσει θετικά στην αλλαγή της συμπεριφοράς των χειριστών τροφίμων (Clayton *et al.*, 2002).

Για την αλλαγή της συμπεριφοράς και την τήρηση των κανόνων υγιεινής, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η εκπαίδευση του προσωπικού η οποία θα συντελέσει στην ασφάλεια των τροφίμων (Hammond *et al.*, 2005). Τόσο η

εκπαίδευση όσο και οι διαδικασίες υγιεινής συντελούν στη μείωση της μετάδοσης του *E. coli* O157:H7 και άλλων παθογόνων. Κρίνεται αναγκαίο το προσωπικό σε κάθε επιχείρηση να γνωρίζει τους πιθανούς κινδύνους και να πληροί τις προδιαγραφές εν ώρα εργασίας με σκοπό την παραγωγή ασφαλών τροφίμων απαλλαγμένων από οποιοδήποτε κίνδυνο.

Οι βιομηχανίες τροφίμων οφείλουν να έχουν τη συνεχή επιτήρηση στους χώρους τους για τον έλεγχο των τρωκτικών, των εντόμων και άλλων ζώων. Πολλές βιομηχανίες έχουν υιοθετήσει διάφορες διαδικασίες για την πρόληψη των κινδύνων αυτών. Ένα ενεργό σύστημα κατά των τρωκτικών είναι απαραίτητο για τη συνεχή επιτήρηση. Παράλληλα με τον έλεγχο των τρωκτικών, η εναέρια μεταφορά αποτελεί πιθανή πηγή μόλυνσης στις βιομηχανίες. Το σύστημα αερισμού πρέπει να διατηρείται και να παρέχεται στο υγειονομικό σύστημα καθημερινά. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καθαρισμού, το *E. coli* O157:H7 μπορεί να μεταφερθεί μέσω του αέρα και να παραμείνει στον αέρα για κάποιο χρονικό διάστημα το οποίο εξαρτάται από το μέγεθος των σταγονιδίων. Για το λόγο αυτό, οι ανεμιστήρες και άλλα μέσα για την κυκλοφορία του αέρα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή στις περιοχές όπου υπάρχουν ωμά προϊόντα και μπορούν να έρθουν σε επαφή με κατεψυγμένα ή άλλα επεξεργασμένα προϊόντα.

1.7 ΤΡΟΠΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ *E. coli* O157:H7

Η μικροβιολογική σταθερότητα των τροφίμων αποτελεί πρωταρχική ανάγκη με σκοπό την παραγωγή ασφαλών και υγιεινών τροφίμων απαλλαγμένα από την παρουσία μικροοργανισμών. Αρκετά χρόνια πριν, η θεωρία των εμποδίων αναπτύχθηκε ως μια νέα αντίληψη για την υλοποίηση ασφαλών και σταθερών τροφίμων, θρεπτικών, νόστιμων και οικονομικών. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιεί έναν συνδυασμό παραγόντων όπως είναι η θέρμανση, η ψύξη, η ξήρανση, το αλάτισμα, η οξίνιση κλπ με σκοπό την επίτευξη της αναστολής της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα (McMeekin *et al.*, 2000). Αποτελεί μια πολύ

σημαντική προσέγγιση για την συντήρηση των τροφίμων, καθώς λόγω της συνδυαστικής ή πολλές φορές συνεργιστικής επίδρασης τους, μπορούν να εφαρμοστούν σε χαμηλότερη ένταση από αυτή που θα χρειαζόταν εάν ένα μόνο εμπόδιο χρησιμοποιούταν ως παράγοντας συντήρησης.

Όσον αφορά την αναστολή του *E. coli* O157:H7, πολλοί είναι οι παράγοντες αυτοί που χρησιμοποιούνται ευρέως για την αδρανοποίηση του. Πρωταρχικό ρόλο διαδραματίζει η θερμική επεξεργασία, σύμφωνα με την οποία, με την κατάλληλη θερμοκρασία (71 °C) ο μικροοργανισμός θανατώνεται. Άλλα εμπόδια για τον έλεγχο του *E. coli* είναι η κατάψυξη που σταματάει το μικροβιακό πολλαπλασιασμό, η χαμηλή ενεργότητα ύδατος, το pH, η οξίνιση και διάφορα συντηρητικά. Επιπλέον, σύμφωνα με έρευνα, μελετήθηκε η επίδραση της τρανς-σιναμαλδεύδης (TC) στην θερμική αδρανοποίηση του *E. coli* σε μαγειρεμένα μπιφτέκια από βόειο κρέας και διαπιστώθηκε ότι η TC βελτιώνει την θερμική αδρανοποίηση του παθογόνου (Amalaradjou *et al.*, 2010). Εκτός από τα εμπόδια που χρησιμοποιούνται, μέτρα για την πρόληψη και τον έλεγχο του *E. coli* O157:H7 πραγματοποιούνται τόσο από τις βιομηχανίες κρέατος όσο και από τις αρμόδιες αρχές που ενημερώνουν συνεχώς τους καταναλωτές για την προφύλαξη τους.

Ωστόσο, πρόσφατα, ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι ο συνδυασμός εμποδίων ήταν λιγότερο αποτελεσματικός στη μείωση των επιπέδων του *E. coli* σε σχέση με εμπόδια που δεν χρησιμοποιούνταν σε συνδυασμό αλλά ανεξάρτητα το ένα από το άλλο (Casey & Condon, 2002). Ως εκ τούτου, η εφαρμογή της έννοιας εμπόδιο στη συντήρηση των τροφίμων ενδέχεται να προκαλέσει αναστολή των μικροοργανισμών αλλά μπορεί να προκαλέσει επίσης και παρατεταμένη επιβίωση του *E. coli* O157:H7 σε τρόφιμα (Uyttendaele, Taverniers, & Debevere, 2001).

Εκτός από τους μηχανισμούς που χρησιμοποιεί ο ίδιος ο παθογόνος με σκοπό να εγκλιματιστεί στις διάφορες καταπονήσεις, πολλές είναι οι μελέτες που έχουν αποδείξει τη συμβολή παραγόντων στην επιβίωση του. Παραδείγματα παραγόντων που έχουν μελετηθεί ότι συμβάλλουν στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 είναι η παρατεταμένη κατάψυξη, το ποσοστό λίπους που υπάρχει στα μπιφτέκια από βόειο κρέας καθώς επίσης και η περιεκτικότητα σε NaCl.

1.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΤΑ ΜΠΙΦΤΕΚΙΑ ΑΠΟ ΒΟΕΙΟ ΚΡΕΑΣ

Για την αδρανοποίηση του *E. coli* O157:H7, παράγοντα ύψιστης σημασίας αποτελεί η θερμική επεξεργασία. Η κατάλληλη θερμική επεξεργασία αποτελεί το κλειδί για την εξάλειψη του παθογόνου σε περίπτωση που έχει επιμολύνει το προϊόν. Τα τελευταία χρόνια η διαδικασία μαγειρέματος των μπιφτεκιών από βόειο κρέας έχει προκαλέσει ανησυχία λόγω διαφόρων περιστατικών τροφικής δηλητηρίασης τα οποία οφείλονται στον παθογόνο αυτό. Διάφορες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην θερμική επεξεργασία των μπιφτεκιών και των συστατικών από τα οποία αποτελούνται. Επίσης έχει μελετηθεί η επίδραση της κατάψυξης και της απόψυξης στην επιβίωση του παθογόνου καθώς επίσης και η θερμοανθεκτικότητα που ενδέχεται να αποκτήσει. Όσον αφορά την θερμική επεξεργασία παρά το γεγονός ότι σχετική νομοθεσία και οδηγίες χειρισμού υπάρχουν, τα πορίσματα των ερευνών οδηγούν σε λάθος χειρισμούς από τους καταναλωτές είτε λόγω αμέλειας είτε λόγω προτίμησης. Όσον αφορά την κατάψυξη και την απόψυξη στα μπιφτέκια καθώς και τα διάφορα συστατικά που μπορεί να διαθέτουν, υπάρχουν μελέτες που τα συνδέουν τόσο με την επιβίωση όσο και με την αναστολή του *E. coli* O157:H7.

Τα μπιφτέκια από βόειο κρέας μπορούν να χωριστούν ανάλογα με το βαθμό μαγειρέματος τους σε ελαφρώς ψημένα έτσι ώστε το εσωτερικό να εξακολουθεί να έχει κόκκινο χρώμα (60 °C), ελαφρώς-μέτρια ψημένα (65 °C), μέτρια ψημένα (71 °C) και καλά ψημένα (77 °C) (Marksberry *et al.*, 1993). Σύμφωνα με το USDA, οι οδηγίες χειρισμού για τους καταναλωτές δηλώνουν ότι τα αλεσμένα κρέατα πρέπει να μαγειρεύονται σε εσωτερική θερμοκρασία τους 71.1 °C όπως αυτή μετράται με ένα θερμόμετρο τροφίμων (U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. 2005).

Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε από το USDA σχετικά με την προτίμηση των καταναλωτών στο βαθμό μαγειρέματος των μπιφτεκιών, το 20 % των συμμετεχόντων δήλωσε ότι προτιμάει τα μπιφτέκια από βόειο κρέας ελαφρώς ψημένα (60 °C) ή ελαφρώς ψημένα-μέτρια (65 °C) (USDA, 1998b). Αυτή η καταναλωτική προτίμηση ενέχει σοβαρό κίνδυνο για την υγεία καθώς για την εξάλειψη του παθογόνου είναι απαραίτητη η θερμική επεξεργασία στο γεωμετρικό κέντρο του μπιφτεκιού στους 71.1 °C. Επιπλέον σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο

Wyndmoor στην Αμερική σε 4 μεγάλες αλυσίδες καταστημάτων το φθινόπωρο του 2010 και του 2011, καταγράφηκε μία μεγάλη γκάμα από μπιφτέκια με διαφορετική σύσταση που κυκλοφορούν στην αγορά. Σχεδόν σε κάθε συσκευασία υπήρχε επισήμανση και ετικέτα για ασφαλή χειρισμό. Επίσης αναγραφόταν στις οδηγίες χειρισμού η κατάλληλη θερμοκρασία μαγειρέματος στους 71.1 °C για την διασφάλιση της ασφάλειας (Luchansky *et al.*, 2013).

Παρά τις προσπάθειες των βιομηχανιών τροφίμων να τηρούν τη νομοθεσία, να παράγουν ασφαλή προϊόντα και να γνωστοποιούν στους καταναλωτές τις οδηγίες χειρισμού και την αποδεκτή θερμοκρασία μαγειρέματος, οι έρευνες αποδεικνύουν ότι οι λανθασμένοι χειρισμοί των καταναλωτών συντελούν στα κρούσματα από *E. coli* O157:H7.

1.8.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΑΓΕΙΡΕΜΑΤΟΣ

Ο αντίκτυπος των διαφόρων μεθόδων μαγειρέματος στην επιβίωση των παθογόνων έχει ευρέως μελετηθεί στη βιβλιογραφία (Shen *et al.*, 2011a; Rhee *et al.*, 2003; D'Sa *et al.*, 2000). Σύμφωνα με μελέτη σε εμβολιασμένα με *E. coli* O157:H7 μπιφτέκια, ως μέθοδοι μαγειρέματος για την θερμική αδρανοποίηση του παθογόνου, χρησιμοποιήθηκαν ο φούρνος και το grill. Τα δεδομένα έδειξαν ότι πραγματοποιήθηκε μεγαλύτερη θανάτωση του παθογόνου όταν τα μπιφτέκια μαγειρεύτηκαν στο φούρνο σε σχέση με όταν μαγειρευτήκαν στο grill. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τις τιμές F-values οι οποίες ήταν υψηλότερες μετά την θερμική επεξεργασία των μπιφτεκιών στον φούρνο στους 71 °C συγκριτικά με την θερμική επεξεργασία στο grill στην ίδια θερμοκρασία (Manios και Skandamis, 2015). Σε παρόμοια αποτελέσματα οδήγησε και η έρευνα με μεθόδους μαγειρέματος το roasting που αποτελεί συγκρίσιμη μέθοδο με το φούρνο και το τηγάνι (pan-grill) συγκρίσιμο με το grill. Τα δεδομένα οδήγησαν σε παρόμοια αποτελέσματα καθώς η θερμική επεξεργασία που πραγματοποιήθηκε σε εμβολιασμένες με *E. coli* O157:H7 μοσχαρίσιες μπριζόλες έδειξε μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου

όταν οι μοσχαρίσιες μπριζόλες μαγειρεύτηκαν με τη μέθοδο roasting σε σχέση με το τηγάνι (Shen *et al.*, 2010). Επίσης παρόμοια μελέτη σε εμβολιασμένα με *E. coli* O157:H7 μπιφτέκια από βόειο κρέας πραγματοποιήθηκε με μεθόδους το open-flame gas παρόμοια με το grill και το clamshell electric grill ένα είδος ψηστιέρας με πλάκες τόσο στην πάνω όσο και στην κάτω επιφάνεια. Τα δεδομένα οδήγησαν στα συμπεράσματα ότι το clamshell electric grill οδηγεί σε μεγαλύτερη θανάτωση του παθογόνου καθώς στη μέθοδο αυτή ρέει θερμότητα και στην πάνω αλλά και στην κάτω επιφάνεια του μηχανήματος εν αντιθέση με το open-flame gas στο οποίο η θερμότητα ρέει μόνο από την κάτω επιφάνεια (Luchansky *et al.*, 2013).

Όσον αφορά το φούρνο, τα προφίλ χρόνου-θερμοκρασίας έδειξαν ότι η μεταφορά θερμότητας ήταν χαμηλότερη σε σχέση με το grill. Λόγω της χαμηλότερης μεταφοράς της θερμότητας στο φούρνο, αυτή διανέμεται ομοιόμορφα στα μπιφτέκια και ο παθογόνος εκτίθεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε θανατηφόρες θερμοκρασίες. Επιπλέον όσον αφορά το grill η μεταφορά θερμότητας πραγματοποιείται μόνο με αγωγιμότητα σε σχέση με το φούρνο που η μεταφορά θερμότητας πραγματοποιείται τόσο με συναγωγή όσο και με αγωγιμότητα. Αδιαμφισβήτητα ο φούρνος αποτελεί την πιο καλή μέθοδο για την θερμική αδρανοποίηση του παθογόνου καθώς ύψιστης σημασίας αποτελεί το γεγονός ότι τα δεδομένα έδειξαν ότι το grill δεν είναι ικανό να εξαλείψει την παρουσία του παθογόνου ακόμα και στην περίπτωση που η εσωτερική θερμοκρασία στόχος είναι οι 71 °C (Manios και Skandamis, 2015).

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές που έχουν εκδοθεί, αναφέρεται η εσωτερική θερμοκρασία μαγειρέματος των αλεσμένων κρεάτων στους 71.1 °C. Με τις συστάσεις αυτές διασφαλίζεται επαρκώς η ασφάλεια των αλεσμένων προϊόντων (USDA-FSIS, 2013b). Όμως σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες υπάρχει ευρεία χρήση διαφορετικών μεθόδων για την θερμική επεξεργασία των μπιφτεκιών και τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορές στη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου. Ύψιστης σημασίας αποτελεί το γεγονός ότι το grill, μία ευρεία μέθοδος μαγειρέματος, δεν εξαλείφει την παρουσία του παθογόνου κάτι που ενέχει κινδύνους για την υγεία και έρχεται σε αντίθεση με τις επίσημες συστάσεις. Η κατάλληλη θερμοκρασία μαγειρέματος δεν φαίνεται να συνδέεται σαφώς με τη μέθοδο μαγειρέματος.

1.8.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΨΗΣΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΧΡΩΜΑ

Σύμφωνα με έρευνα του USDA σχετικά με το μαγείρεμα των μπιφτεκιών, το 20 % των συμμετεχόντων δήλωσε ότι προτιμάει τα μπιφτεκία ελαφρώς-μέτρια ψημένα (USDA, 1998b) κάτι που ενέχει κίνδυνο για την επιβίωση του *E. coli* O157:H7 στην περίπτωση που αυτό έχει μολύνει το κρέας. Επιπλέον, οι περισσότεροι καταναλωτές αξιολογούν το μαγείρεμα του μπιφτεκιού χωρίζοντας το στη μέση και επισημαίνοντας το χρώμα (Rhee *et al.*, 2003). Αυτή η πρακτική αποκλίνει κατά πολύ από τις επίσημες συστάσεις. Το χρώμα στο γεωμετρικό κέντρο του μπιφτεκιού μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες εκτός της θερμοκρασίας, δίνοντας έτσι λανθασμένες εκτιμήσεις σχετικά με την ασφάλεια του τελικού προϊόντος (King (née Turner) and Whyte, 2006). Οι καταναλωτές ενδέχεται να παραπλανηθούν από το χρώμα λόγω της πρόωρης αμαύρωσης που πραγματοποιείται στα μπιφτεκία. Σύμφωνα με έρευνα, η συχνότητα της πρόωρης αμαύρωσης ήταν σε ποσοστό 47 % για τα μπιφτεκία βόειου κρέατος σε καταστήματα λιανικής πώλησης στις ΗΠΑ (Killinger *et al.*, 2000). Αναντίρρητα η αξιολόγηση του μαγειρέματος με βάση το χρώμα μπορεί να επιφέρει αρνητικές συνέπειες καθώς σε μπιφτεκία τυχόν επιμολυσμένα, η πιθανότητα ανάκτησης κυττάρων μετά την θερμική επεξεργασία είναι πιθανή λόγω ανεπαρκούς θερμικής επεξεργασίας (πρόωρη αμαύρωση προϊόντος) και λανθασμένης αξιολόγησης μαγειρέματος.

Πολλές φορές είναι δύσκολο να αξιολογηθεί η θερμοκρασία στο γεωμετρικό κέντρο του μπιφτεκιού ιδιαίτερα λόγω της πρόωρης αμαύρωσης που ενδέχεται να παραπλανήσει τους καταναλωτές. Για το λόγο αυτό τα διάφορα συστήματα της ασφάλειας των τροφίμων συνιστούν τη χρήση θερμόμετρου για την καταγραφή της θερμοκρασίας. Η χρήση θερμόμετρου στο γεωμετρικό κέντρο των ψημένων μπιφτεκιών είναι περιορισμένη (National Cattlemen's Beef Association, 1999). Σύμφωνα με έρευνες έχει υπολογιστεί ότι μόνο το 14 % των καταναλωτών το χρησιμοποιεί για την αξιολόγηση της θερμοκρασίας στο γεωμετρικό κέντρο των μπιφτεκιών (Luchansky *et al.*, 2013).

Ανεξάρτητα με το αν τα μπιφτεκία μαγειρεύονται μέσα στο σπίτι ή σε κάποιο κέντρο μαζικής εστίασης, η χρήση θερμόμετρου είναι απαραίτητη για να διασφαλιστεί η τελική εσωτερική θερμοκρασία.

1.9 Η ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ *E. coli* O157:H7

Διάφορες έρευνες έχουν μελετήσει την θερμοανθεκτικότητα του *E. coli* O157:H7 ακολουθώντας εργαστηριακές τεχνικές όπως τον εμβολιασμό των μπιφτεκιών από βόειο κρέας με τον συγκεκριμένο παθογόνο (Ahmed *et al.*, 1995; Juneja *et al.*, 1997). Λόγω του ότι η επιβίωση του παθογόνου αυτού κατά το μαγείρεμα έχει προκαλέσει αιτία για πολλά κρούσματα (Mermelstein, 1993), υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό της θερμικής αντίστασης του (heat resistance). Αυτός ο ορότυπος έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με άλλους τύπους του *E. coli* (Gibson και Roberts, 1986) αλλά διαφέρει στην ικανότητά του να ζυμώνει τη σορβιτόλη, να παράγει το ένζυμο β-γλυκουρονιδάση και να παρουσιάζει σημαντική αντίσταση σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως είναι οι όξινες συνθήκες, η κατάψυξη και η επιβίωση σε χαμηλές θερμοκρασίες (Conner and Hall 1994). Όσον αφορά την θερμική του αντίσταση, δεν παρουσιάζει αξιοσημείωτη θερμοανθεκτικότητα (D60 ισούται με 0.1 min).

Οι ενδογενείς και οι εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν την θερμική αντίσταση δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς και υπάρχουν κενά στη βιβλιογραφία. Απομονωμένα στελέχη του *E. coli* O157:H7 ποικίλλουν σημαντικά στην θερμική τους αντίσταση (Ahmed, 1994) και οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να αυξήσουν τις τιμές D (D-values) (Murano and Pierson, 1993). Μελέτες έδειξαν ότι η όξινη καταπόνηση ενισχύει την μετέπειτα όξινη αντίσταση, την θερμική αντίσταση και την αντίσταση στην κατάψυξη - απόψυξη (Leenanon and Drake, 2001; Leyer, 1995; Williams and Ingham, 1998). Το θερμικό σοκ ενισχύει την θερμική και την όξινη αντοχή (Juneja, 1998; Wang and Doyle, 1998). Οι μηχανισμοί όξινης αντίστασης των βακτηρίων ίσως αναστέλλονται σε χαμηλές θερμοκρασίες ή από παράγοντες που εκφράζονται κάτω από αυτές τις συνθήκες όπως είναι οι πρωτεΐνες cold shock. Ο παράγοντας σίγμα (sigma factor σ^S) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *rpoS* διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην απόκριση στην καταπόνηση και την όξινη αντίσταση (Audia *et al.*, 2001).

Ο ρόλος του *R_{pos}* μπορεί να μειωθεί όταν επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η καταπόνηση λόγω χαμηλής θερμοκρασίας (cold stress) ενισχύει την αντοχή του *E. coli* στην κατάψυξη - απόψυξη (Leenanon and Drake, 2001; Goldstein, 1990). Σύμφωνα με αποτελέσματα σχετικής έρευνας, η

καταπόνηση και η όξινη καταπόνηση λόγω χαμηλών θερμοκρασιών ενίσχυσαν ελαφρώς τη θερμική αντίσταση του *E. coli* O157:H7 (Elhanafi *et al.*, 2003).

1.9.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *E. coli* O157:H7

1.9.1.1 ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΝΑΤΡΙΟ

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν ερευνήσει το αποτέλεσμα του συνδυασμού του NaCl και της θέρμανσης κατά την θερμική επεξεργασία. Σε πολλές μελέτες, η προσθήκη NaCl ή άλλων συστατικών αυξάνει την αντοχή στην θερμότητα των παθογόνων βακτηρίων συμπεριλαμβανομένου και του *E. coli* O157:H7, λόγω του ότι μειώνουν την ενεργότητα του νερού (a_w) των δειγμάτων. Η θερμότητα και το NaCl, γνωστοί ανασταλτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται συχνά σε συνδυασμό με σκοπό την ασφάλεια των τροφίμων σε πολλά προϊόντα διατροφής.

Σύμφωνα με έρευνα, ο συνδυασμός του NaCl σε ποσοστό 3 % σε συνδυασμό με θερμοκρασία στους 55 °C, δεν έδωσε σημαντική διαφορά στη μείωση του *E. coli* O157:H7 σε εργαστηριακά μέσα. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να έχει συμβεί επειδή το ποσοστό 3 % NaCl δεν ήταν αρκετό για να δείξει το συνεργιστικό αποτέλεσμα. Παρατηρήθηκαν μόνο μικρές μειώσεις της ενεργότητας ύδατος (a_w) (Sun-Young Lee and Dong-Hyun Kang, 2009). Σύμφωνα με άλλες έρευνες, η προσθήκη NaCl ή άλλων συστατικών αυξάνει την αντοχή στην θερμότητα των παθογόνων βακτηρίων συμπεριλαμβανομένου του *E. coli* O157:H7, διότι μειώνουν την ενεργότητα του νερού (a_w) των δειγμάτων. Η θερμοανθεκτικότητα του *E. coli* O157:H7 αυξάνεται με την αύξηση του NaCl σε ποσότητα έως και 8.5 % (w/w). Ένα παρόμοιο αποτέλεσμα έχει παρατηρηθεί για τη *Listeria monocytogenes* σε συγκεντρώσεις NaCl έως και 4,5 % (Cole, Davies, Munro, Xoliok & Kilsby, 1993). Τα δεδομένα αυτά τεκμηριώνονται και από άλλη έρευνα στην οποία μελετήθηκε η επίδραση τόσο του ποσοστού 3 % όσο και του 8,5 % NaCl σε συνδυασμό με την θερμική επεξεργασία και έδειξε ότι το

ποσοστό 3 % δεν ήταν ικανό να αυξήσει την θερμοανθεκτικότητα του *E. coli* O157:H7 εν αντιθέση με το 8,5 % NaCl (Blackburn *et al.*, 1997) (διάγραμμα 1.9.1.1.1). Παρατηρείται λοιπόν αλλαγή στη συμπεριφορά του NaCl όταν συνδυάζεται με την θερμική επεξεργασία καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του, από ανασταλτικός παράγοντας έχει τη δυνατότητα να προσδώσει θερμική αντίσταση στον παθογόνο.

Table 2
 $D_{62.5^{\circ}\text{C}}$ (s) of *E. coli* O157:H7 strains

Conditions	Strain no			
	E30138	E30228	E30480	E32511
0.5% w/w NaCl, pH 4.3	19	34	15	33
3.5% w/w NaCl, pH 5.1	62	112	80	59
8.5% w/w NaCl, pH 4.3	140	158	108	114

Διάγραμμα 1.9.1.1.1 Επίδραση περιεκτικότητας άλατος στην επιβίωση του *E. coli* O157:H7 (Blackburn *et al.*, 1997).

1.9.1.2 ΛΙΠΟΣ

Τα μπιφτέκια χαρακτηρίζονται από υψηλό ποσοστού λίπους, πάνω από 20 % σύμφωνα με τους ευρωπαϊκούς κανονισμούς ή πάνω από 30 % στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (BOE, 1998, pp. 1086e 1101; Code of Federal Regulations, 2012). Το ποσοστό του λίπους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα τρόφιμα. Συμβάλλει στην ανάπτυξη των αρωματικών ενώσεων, στην αντίληψη της τρυφερότητας, στο κατά πόσο χυμώδες είναι το τρόφιμο και στην καλύτερη αίσθηση στο στόμα καθώς προσδίδει γεύση στο προϊόν (Berry, 1992). Επιπλέον, τα λίπη είναι γνωστά ως ένα από τα πλέον χημικώς ασταθή συστατικά των τροφίμων και ευκόλως υφίστανται οξειδωτικές

αντιδράσεις, υπεύθυνες για την απώλεια της ποιότητας και της διατροφικής αξίας του κρέατος (Faustman, Sun, Mancini, & Suman, 2010).

Όσον αφορά την θερμική επεξεργασία και την επίδραση του λίπους στην μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του *E. coli* O157:H7, υπάρχουν πολλές μελέτες που αποδεικνύουν τη μεταξύ τους συσχέτιση. Παράλληλα με την αύξηση του ποσοστού λίπους αυξάνεται η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου, πιθανώς εξαιτίας της μειωμένης ενεργότητας νερού ή και της μειωμένης θερμικής αγωγιμότητας. Σημαντικό ρόλο κατέχει η ευκολότερη διείσδυση του παθογόνου στις πιο λιπαρές τροφές σε σύγκριση με τις λιγότερο λιπαρές (Juneja *et al.*, 1997 και Luchansky *et al.*, 2012). Το λίπος μπορεί να προστατεύσει τον παθογόνο από την θερμική επεξεργασία και να συμβάλλει στην επιβίωση του (Luchansky *et al.*, 2012) (Διάγραμμα 1.9.1.2.1). Όταν τα βακτηριακά κύτταρα αιωρούνται μέσα στο λίπος, η καταστροφή τους είναι πιο δύσκολο να επιτευχθεί σε σχέση με ένα υδατικό μέσο, λόγω της μειωμένης ενεργότητας νερού. Η ενεργότητα νερού σε ένα μέσο εναιώρησης επηρεάζει την θερμική αντίσταση (Banwart, 1981). Η αύξηση της περιεκτικότητας σε λίπος μειώνει την περιεκτικότητα σε νερό, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η μεταφορά θερμότητας. Αυτό πιθανώς αντιπροσωπεύει διαφορές στην επιβίωση του *E. coli* O157:H7.

Πιο συγκεκριμένα σύμφωνα με μελέτη, η θερμική αδρανοποίηση του *E. coli* O157:H7 σε κατεψυγμένα μπιφτέκια ήταν πιο αποτελεσματική στα μπιφτέκια που είχαν χαμηλότερο ποσοστό λίπους σε σχέση με αυτά που είχαν υψηλότερο ποσοστό. Το ποσοστό λίπους ήταν της τάξεως του 70:30. Το υψηλό ποσοστό λίπους φανέρωσε μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα στο *E. coli* O157:H7 (Luchansky *et al.*, 2013). Επιπλέον, άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε μπιφτέκια από βόειο κρέας έδειξε ότι το υψηλότερο ποσοστό λίπους οδήγησε σε υψηλότερες τιμές D (D-values) (Line, 1991 and Huang *et al.*, 1992).

Πίνακας 1.9.1.2.1 Επίδραση περιεκτικότητας λίπους στην επιβίωση του *E. coli* O157:H7 (Luchansky *et al.*, 2013).

Strain	Mean \pm SD <i>D</i> -values (min) at ^b : 65.6°C	
	70:30	93:7
O26:H11	0.06 \pm 0.02 A	0.08 \pm 0.01 A
O45:H2	0.06 \pm 0.01 A	0.06 \pm 0.02 A
O103:H2	0.06 \pm 0.02 A	0.07 \pm 0.01 A
O104:H4	0.24 \pm 0.08 B	0.06 \pm 0.01 B
O111:H ⁻	0.10 \pm 0.0 A	0.05 \pm 0.01 A
O121:H19	0.06 \pm 0.01 A	0.06 \pm 0.01 A
O145:NM	0.05 \pm 0.01 A	0.05 \pm 0.02 A
O157:H7	0.20 \pm 0.02 A	0.06 \pm 0.0 A

1.9.1.3 ΚΑΤΑΨΥΞΗ

Η κατάψυξη είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τη διατήρηση ευπαθών προϊόντων όπως είναι το κρέας και τα προϊόντα με βάση αυτό. Επιτρέπει τη μακροχρόνια αποθήκευση των τροφίμων, τα οποία με την κατάλληλη απόψυξη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φρέσκα προϊόντα (Hui *et al.*, 2004). Στις χαμηλές θερμοκρασίες της κατάψυξης η μικροβιακή αλλοίωση αναστέλλεται καθώς επίσης μειώνονται ορισμένες φυσικοχημικές αλλαγές. Παρόλο που η κατάψυξη δεν συμβάλλει στην εξάλειψη της βακτηριακής μόλυνσης στα τρόφιμα παρά μόνο έχει τη δυνατότητα να σταματήσει τον πιθανό μικροβιακό πολλαπλασιασμό (Beauchamp *et al.*, 2010), τα κύτταρα εκτίθενται σε καταπονήσεις οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε αναστρέψιμες ή μη-αναστρέψιμες μηχανικές βλάβες. Τα βακτηριακά κύτταρα μπορεί να τραυματιστούν κατά τη διάρκεια της κατάψυξης (Mossel and Netten, 1984; Ray,

1986; Musarrat and Ahmad, 1988) αυτό όμως δεν οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κατάψυξη αποτελεί εργαλείο για την εξάλειψη του *E. coli* O157:H7.

Διάφορες μελέτες έχουν ερευνήσει την επίδραση της κατάψυξης στην επιβίωση του *E. coli* O157:H7 σε εμβολιασμένα μπιφτέκια από βόειο κρέας. Σύμφωνα με έρευνα προετοιμάστηκαν μπιφτέκια με τρόπο παρόμοιο με την εμπορική διαδικασία χρησιμοποιώντας βόειο κιμά και κατόπιν εμβολιάστηκαν με *E. coli* O157:H7. Τα δείγματα περιείχαν περίπου $2,5 \log_{10}$ CFU / g *E. coli* O157:H7, καταψύχθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -18°C για 2 μήνες. Η μείωση των επιπέδων του παθογόνου δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($P > 0.05$) (Bolton *et al.*, 2011). Παρόμοια αλλαγή αναφέρθηκε στα επίπεδα του *E. coli* O157:H7 μετά από 2 μήνες αποθήκευσης μπιφτεκιών στην κατάψυξη στους -20°C (Doyle and Schoeni, 1984). Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε εμβολιασμένο βόειο κιμά με 20 % λίπος και αποδείχτηκε η σύνδεση της παρατεταμένης κατάψυξης με την ικανότητα επιβίωσης του παθογόνου. Το *E. coli* O157:H7 μπορεί να επιζήσει πάνω από 4 εβδομάδες μετά τη συντήρηση στην κατάψυξη στους -28°C με πληθυσμιακή μείωση τους 1.5 λογαριθμικούς κύκλους. Η συντήρηση του βόειου κιμά στην κατάψυξη στους -28°C είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση του παθογόνου με μία κατά προσέγγιση μείωση ενός λογαριθμικού κύκλου (Ansary *et al.*, 1999), αποδεικνύοντας την ικανότητα του παθογόνου να επιζεί για μεγάλες χρονικές περιόδους σε θερμοκρασίες κατάψυξης με μικρή μείωση των διαθέσιμων κυττάρων του.

Η κατάψυξη και η αποθήκευση κατεψυγμένων προϊόντων βοηθάει στην πρόληψη της διάδοσης των παθογόνων βακτηρίων και της αλλοίωσης, αλλά δεν είναι αποτελεσματική στην εξάλειψη του *E. coli* O157:H7 όταν αυτό παρευρίσκεται στις πρώτες ύλες και στο προϊόν. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν και με άλλη έρευνα στην οποία σε ωμό κρέας που είχε επιμολυνθεί με *E. coli* O157:H7 και είχε αποθηκευτεί στην κατάψυξη, δεν μπόρεσε να επιτευχθεί η εξάλειψη του παθογόνου μικροοργανισμού (Heuvelink *et al.*, 1999).

Εκτός από τους παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν αδρανοποίηση ή ανθεκτικότητα στους μικροοργανισμούς, όταν οι μικροοργανισμοί εκτίθενται σε περιβαλλοντικές αλλαγές, χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς με σκοπό να προστατευτούν και να καταφέρουν να επιβιώσουν στις διάφορες καταπονήσεις.

1.9.1.4 ΜΕΓΕΘΟΣ ΜΠΙΦΤΕΚΙΩΝ

Λόγω της αυξημένης ζήτησης των μπιφτεκιών σε παγκόσμιο επίπεδο, οι βιομηχανίες κρέατος προσπαθούν συνεχώς να καλύψουν τις ανάγκες των καταναλωτών, δημιουργώντας νέα προϊόντα που ανταποκρίνονται στις προτιμήσεις τους. Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε αλυσίδες σούπερ μάρκετ στην Αμερική, υπήρχε μεγάλη γκάμα και συγκεκριμένα στα μπιφτέκια που διατηρούνταν υπό κατάψυξη και υπό ψύξη, υπήρχε μεγάλη διακύμανση τόσο στο μέγεθος τους (ακανόνιστο, στρογγυλό, οβάλ κλπ), στο βάρος (84 - 168 g) όσο και στη διάμετρο τους (9.2 – 12.5 cm) (Luchansky *et al.*, 2013).

Η διακύμανση αυτή εκφράζει αρκετά ερωτήματα σχετικά με την θερμική επεξεργασία των μπιφτεκιών. Όσον αφορά τα μπιφτέκια με μεγάλο μέγεθος καθώς επίσης και τα μπιφτέκια που τοποθετούνται για ψήσιμο απευθείας από την κατάψυξη, το μαγείρεμα αυτών θα μπορούσε να διαρκέσει έως και το διπλάσιο χρόνο μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή θερμοκρασία μαγειρέματος, σε σχέση με μπιφτέκια που έχουν μικρό μέγεθος. Το μέγεθος των μπιφτεκιών μπορεί να προκαλέσει πιθανή ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων. Στα μπιφτέκια με μεγάλο μέγεθος και στα οποία εμπεριέχονται πυκνά συστατικά, το μαγείρεμα αυτών ενδέχεται να διαρκέσει περισσότερο ή ακόμα και να απαιτεί υψηλότερες θερμοκρασίες για την επίτευξη των θερμοκρασιών μαγειρέματος (American Meat Institute 2010).

Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε μπριζόλες από βόειο κρέας διαφορετικού μεγέθους, οι οποίες εμβολιάστηκαν με τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 και υπέστησαν θερμική καταπόνηση, διαπιστώθηκε η επίδραση της περιεκτικότητας μεγέθους στην επιβίωση του *E. coli* O157:H7. Πιο συγκεκριμένα οι μπριζόλες μεγάλου μεγέθους (4 cm) υπέστησαν περισσότερο χρόνο θερμική επεξεργασία και σε αυτές υπήρξε μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου συγκριτικά με τις μπριζόλες μικρότερου μεγέθους (1.5 cm) (Διάγραμμα 1.9.1.3.1). Όσο αυξάνεται το μέγεθος του προϊόντος καθώς επίσης και ο χρόνος για την επίτευξη της επιθυμητής εσωτερικής θερμοκρασίας στόχου, τόσο μεγαλύτερη είναι η αδρανοποίηση του *E. coli* O157:H7 (Shen *et al.*, 2010).

Πίνακας 1.9.1.4.1 Η επίδραση περιεκτικότητας μεγέθους στην επιβίωση του *E. coli* O157:H7 (Shen *et al.*, 2010)

Cooking		TSAP+rif		
		Steak thickness (cm):		
Procedure	Appliance	1.5	2.5	4.0
Control	Uncooked	6.4 ± 0.1 a	6.4 ± 0.1 a	6.4 ± 0.1 a
Pan broiling	Presto electric skillet	4.7 ± 0.1 b A	4.3 ± 0.4 b A	3.6 ± 0.6 b B
	Sanyo grill	4.8 ± 0.5 b A	4.3 ± 0.3 b A	3.6 ± 0.6 b B
Double pan broiling	George Foreman grill	5.3 ± 0.8 b A	4.6 ± 0.3 b AB	4.1 ± 0.5 b B
Roasting	Oster toaster oven	4.2 ± 0.2 c A	3.7 ± 0.5 c A	2.7 ± 1.1 c B
	Magic Chef kitchen oven	4.4 ± 0.3 bc A	3.5 ± 1.0 bc A	2.2 ± 1.0 c B

1.10 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΙΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΕΙΣ

Όταν οι μικροοργανισμοί καλούνται να προσαρμοστούν στις διάφορες περιβαλλοντικές αλλαγές, πρωτεύον είναι η επιβίωση τους και έπειτα η ανάπτυξη και η εξέλιξη τους στο εκάστοτε περιβάλλον. Με τον τρόπο αυτό καλούνται να υπερνικήσουν τις περιβαλλοντικές προκλήσεις που περιλαμβάνουν μία πληθώρα εμποδίων. Παράδειγμα αποτελεί η όξινη καταπόνηση, η επίδραση υψηλών ή χαμηλών τιμών θερμοκρασίας, η επίδραση λιπαρών οξέων κλπ. Για την προσαρμογή στα περιβαλλοντικά αυτά ερεθίσματα, λαμβάνει χώρα μία σειρά από προγραμματισμένες αποκρίσεις (programmed responses). Στις αποκρίσεις αυτές ανιχνεύεται μία μεταβολή στο περιβάλλον, μεταδίδεται και οδηγεί στην αλλαγή έκφρασης των γονιδίων. Επιπλέον άλλες φορές περιλαμβάνει τον προγραμματισμό ορισμένων γονιδίων. Τα γονίδια αυτά θα υποβληθούν εσκεμμένα σε μεταλλάξεις. Μέσω αυτού του μηχανισμού παράγονται φαινότυποι που οδηγούν σε μικτούς πληθυσμούς κάτι που σημαίνει μεγαλύτερη

παραλλακτικότητα και ικανότητα επιβίωσης. Επιπλέον η διαδικασία αυτή του προγραμματισμού αναφέρεται και ως παραλλαγή φάσης (phase variation). Η παραλλαγή φάσης περιλαμβάνει αλλαγές στη δομή του βακτηριακού DNA που μεσολαβεί της έκφρασης των φαινοτύπων για αντιστροφή μιας περιβαλλοντικής πρόκλησης και δημιουργίας προσαρμοστικότητας στα διάφορα περιβάλλοντα (Salaun *et al.*, 2003). Η αλλαγή στο περιβάλλον προηγείται και έπεται η επιφερόμενη αλλαγή στον μικροοργανισμό. Όσον αφορά την παραλλαγή φάσης, το σύστημα είναι πιο δυναμικό αφού παράγονται συνεχώς νέοι φαινότυποι. Οι οργανισμοί που χρησιμοποιούν την παραλλαγή φάσης για να προσαρμοστούν στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, ίσως υποβάλλονται σε περισσότερες κλωνικές μεταβάσεις. Όσον αφορά τον μικροοργανισμό *E. coli* για να αποφύγει αυτή την κλωνική αντικατάσταση, έχει αναπτύξει μηχανισμούς αντιστροφής που μεσολαβούν στη ρύθμιση των γονιδίων. Παράλληλα διατηρούν ασταθείς επαναλαμβανόμενες ακολουθίες στα γονιδιώματά τους.

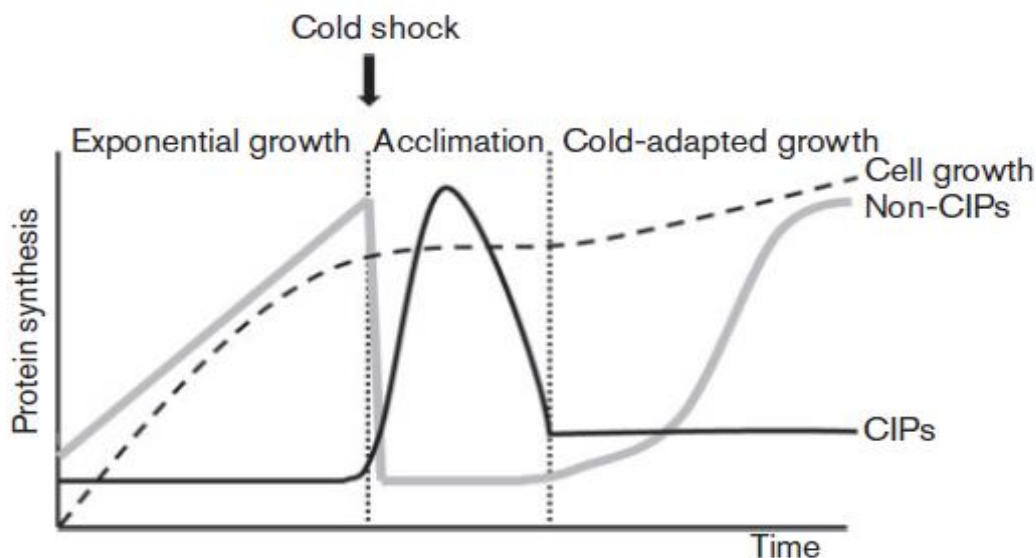
Επιπλέον η έκθεση των μικροβιακών κυττάρων σε υποθανάτιες καταπονήσεις (sublethal stresses), έχει ως αποτέλεσμα την απόκριση στην καταπόνηση και όχι μόνο μπορεί να επιτρέψει στον μικροοργανισμό να επιζήσει, αλλά επίσης μπορεί να ενισχύσει την επακόλουθη αντοχή του στην ίδια καταπόνηση. Επιπλέον ενδέχεται να προκαλέσει την αντοχή του παθογόνου σε μεταγενέστερες καταπονήσεις (cross-protection) (Abee and Wouters, 1999). Όσον αφορά το *E. coli* O157:H7, αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν τεκμηριώσει την απόκριση του στις υποθανάτιες καταπονήσεις.

1.10.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΨΥΞΗΣ

Λόγω των διαφορετικών περιβαλλοντικών αλλαγών (τα θρεπτικά συστατικά, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, το οσμωτικό στρες και οι αλλαγές της θερμοκρασίας), οι μικροοργανισμοί πρέπει να προσαρμόζονται διαρκώς σε αυτές. Μετά από μια μείωση της θερμοκρασίας, ένας αριθμός από σημαντικές αλλαγές συμβαίνει στην κυτταρική φυσιολογία. Παράδειγμα αποτελεί η μείωση της ρευστότητας της μεμβράνης και της σταθεροποίησης των δευτερευουσών δομών των νουκλεϊκών

οξέων, η οποία οδηγεί σε μειωμένη αποτελεσματικότητα της μεταγραφής του RNA, της μετάφρασης και της αποικοδόμησης (υποβάθμιση) (Phadtare, 2004). Η απόκριση στις χαμηλές θερμοκρασίες (cold shock response) επιτρέπει στο κύτταρο να αντιμετωπίσει αυτές τις δυσμενείς αλλαγές, ως επί το πλείστον από την επιλεκτική παραγωγή ενός συνόλου πρωτεϊνών, όπως των πρωτεϊνών που επάγονται από τις χαμηλές θερμοκρασίες (cold induced proteins).

Σε εργαστηριακές συνθήκες, η απόκριση στις χαμηλές θερμοκρασίες (Διάγραμμα 1.10.1) ενεργοποιείται από μια απότομη μετατόπιση της καλλιέργειας αυξανόμενη εκθετικά από τη βέλτιστη θερμοκρασία σε μια χαμηλότερη θερμοκρασία, συνήθως από τους 37 °C στους 15 °C. Με τη μείωση της θερμοκρασίας υπάρχει μία παροδική διακοπή της ανάπτυξης των κυττάρων από 3 έως 6 ώρες. Αυτή η περίοδος ονομάζεται φάση εγκλιματισμού. Κατά τη φάση εγκλιματισμού, η παραγωγή των περισσότερων πρωτεϊνών σταματά, εκτός από τις πρωτεΐνες που επάγονται από τις χαμηλές θερμοκρασίες οι οποίες εξακολουθούν να μεταφράζονται (Polissi *et al.*, 2003). Μετά τη φάση του εγκλιματισμού, τα κύτταρα προσαρμόζονται στη χαμηλή θερμοκρασία και αναπτύσσονται αλλά με βραδύτερο ρυθμό (Phadtare, 2004).

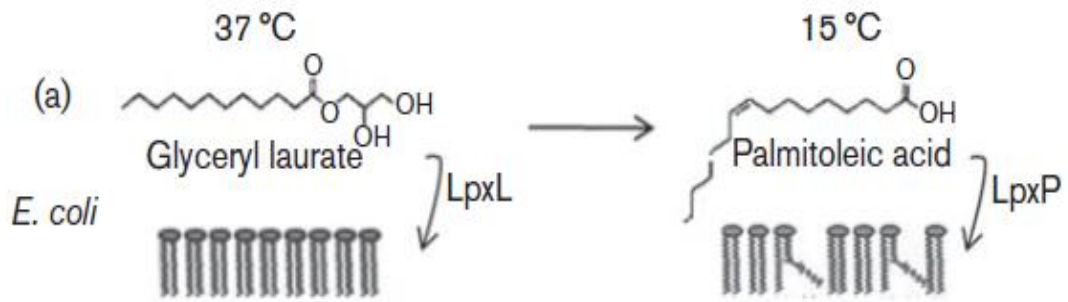


Διάγραμμα 1.10.1.1 Διαδικασία προσαρμογής στις χαμηλές θερμοκρασίες

Μετά την επαγωγή στις χαμηλές θερμοκρασίες (Διάγραμμα 1.10.1.1) η κυτταρική ανάπτυξη (διακεκομμένη γραμμή) σταματάει για αρκετές ώρες (φάση εγκλιματισμού). Κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού, η σύνθεση των πρωτεϊνών (non CIPS - γκρι γραμμή) περιορίζεται, ενώ το μικρό κλάσμα των πρωτεϊνών που επάγεται από τις χαμηλές θερμοκρασίες (CIPs) εκφράζεται (μαύρη γραμμή). Μετά τη φάση του εγκλιματισμού, η ανάπτυξη και η παραγωγή των πρωτεϊνών ξαναρχίζει με πιο αργούς ρυθμούς και τα περισσότερα από τα CIPs αναστέλλονται (Horn *et al.*, 2007).

1.10.2 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Μία ταχεία μείωση της θερμοκρασίας μπορεί να επάγει το διαχωρισμό της φάσης της κυτταρικής μεμβράνης των φωσφολιπιδίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ρευστότητας της μεμβράνης και μία αύξηση στη διαπερατότητα της (Cao-Hoang *et al.*, 2010). Η μεμβράνη των Gram⁻ κυττάρων αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Το λιπίδιο A αποτελείται από δύο γλυκοζαμίνες με επισυναπτόμενες αλυσίδες ακυλίου (λιπαρά οξέα). Το λαυρικό είναι η αλυσίδα του λιπαρού ακυλίου που συνήθως εντοπίζεται στα κύτταρα που αναπτύσσονται στους 37 °C. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, υπάρχει μια μείωση του λαυρικού η οποία αντισταθμίζεται από την εμφάνιση του παλμιτολεϊκού που είναι ακόρεστο λιπαρό οξύ εν αντιθέση με το λαυρικό (Carty *et al.*, 1999). Η παρουσία του παλμιτολεϊκού αυξάνει τη ρευστότητα της μεμβράνης και αντιδράει στην επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας. Στο *E. coli* (Εικόνα 1.10.2.1), η ακυλοτρανσφεράση LpxP που αποτελεί πρωτεΐνη που επάγεται από τις χαμηλές θερμοκρασίες, είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση του παλμιτολεϊκού προς το λιπίδιο A κατά τη μείωση της θερμοκρασίας (Vorachek-Warren *et al.*, 2002).

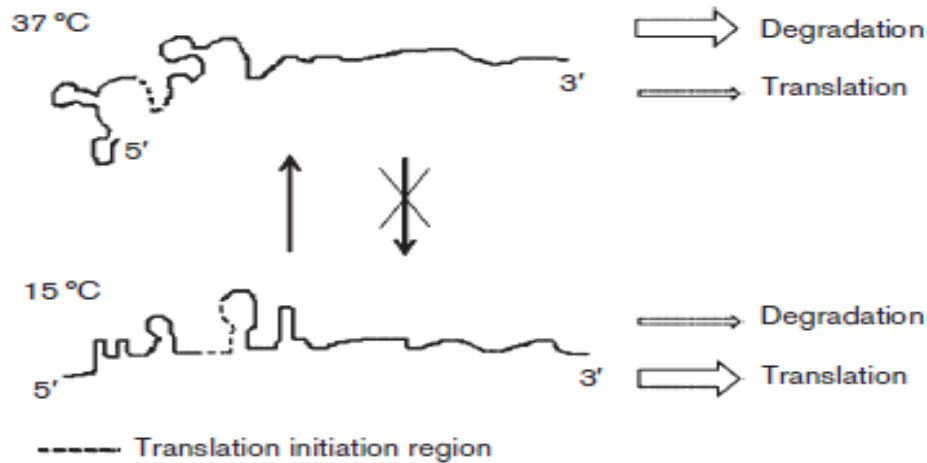


Εικόνα 1.10.2.1 Προσαρμογή της κυτταρικής μεμβράνης στις χαμηλές θερμοκρασίες

1.10.3 ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Κατά τη διάρκεια της προσαρμογής στις χαμηλές θερμοκρασίες, η έκφραση των περισσότερων πρωτεϊνών περιορίζεται αλλά οι πρωτεΐνες που επάγονται από τις χαμηλές θερμοκρασίες (cold-induced proteins) συνεχίζουν να εκφράζονται ή ακόμη και να επάγονται. Όσον αφορά την επαγωγή αυτή, δεν υπάρχουν ειδικοί παράγοντες μεταγραφής που να ευθύνονται για αυτήν. Φαίνεται ότι η ρύθμιση βασίζεται περισσότερο σε αλλαγές στην σταθερότητα του mRNA και στην πρόσβαση στο μηχανισμό της μετάφρασης.

Το CspA που επάγεται από τις χαμηλές θερμοκρασίες (CspA cold induction) έχει μελετηθεί πολύ εκτεταμένα και είναι γνωστό ότι είναι πολύ αυστηρά ρυθμιζόμενο (Εικόνα 1.10.3.1). Σε συνθήκες ψύχους, το CspA αντιπροσωπεύει σχεδόν το 13 % του συνόλου των πρωτεϊνών του κυττάρου, ενώ στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ μειώνεται σε αρκετά χαμηλά επίπεδα (Goldstein *et al.*, 1990). Με τη μείωση της θερμοκρασίας, η δομή του 5'UTR του CspA mRNA αλλάζει. Η αναδιάταξη του CspA 5'UTR σε χαμηλές θερμοκρασίες σταθεροποιεί το mRNA και διασφαλίζει την πιο σταθερή μετάφραση του (Giuliodori *et al.*, 2010).



Εικόνα 1.10.3.1 Το CspA mRNA ως ένα θερμοστοιχείο

1.11 ΥΠΟΘΕΣΗ & ΣΤΟΧΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ

Πληθώρα μελετών έχει επικεντρωθεί στον τρόπο μετάδοσης, επιβίωσης και ελέγχου του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 στην αλυσίδα του βοείου κρέατος (Duffy *et al.*, 2006). Το *E. coli* O157:H7 λόγω των πολλαπλών κρουσμάτων που έχει προκαλέσει ύστερα από την κατανάλωση μολυσμένων μπιφτεκιών, θεωρείται ένας από τους πιο μελετημένους παθογόνους μικροοργανισμούς. Εργαστηριακές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την θερμική επεξεργασία και τη μετέπειτα θερμική αδρανοποίηση του συγκεκριμένου παθογόνου, την θερμοανθεκτικότητα που ενδέχεται να αποκτήσει καθώς επίσης και διάφορους παράγοντες που έχει αποδειχτεί ότι συμβάλουν είτε θετικά είτε αρνητικά στην θερμοανθεκτικότητα. Παραδείγματα παραγόντων αποτελούν η κατάψυξη που αποτελεί ευρεία μέθοδο συντήρησης των προϊόντων καθώς επίσης και συστατικά που εντοπίζονται στα μπιφτεκία από βόειο κρέας όπως το λίπος και το NaCl τα οποία διαδραματίζουν ρόλο στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου.

Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα μελέτες, όσον αφορά τους παράγοντες που προαναφέρθηκαν, έχει εξετασθεί η μεμονωμένη επίδραση τους και έχει αποδειχτεί

ότι συμβάλλουν στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου. Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι δεν υπάρχουν ενδείξεις σχετικά με τη συνδυαστική δράση αυτών των παραγόντων. Βιβλιογραφικά δεν υπάρχει αναφορά που να μιλάει για τη συνδυαστική δράση και πως αυτή επηρεάζει την θερμοανθεκτικότητα του *E. coli* O157:H7.

1.12 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εξετασθεί η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *E. coli* O157:H7 σε μπιφτέκια βόειου κιμά όπως αυτή επηρεάζεται από:

- τη διάρκεια κατάψυξης
- τον ρυθμό κατάψυξης
- την περιεκτικότητα του κιμά σε λίπος
- την περιεκτικότητα του κιμά σε NaCl
- το πάχος των μπιφτεκιών

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Αρχικά παρατίθενται περιληπτικά όλα τα στάδια του πειραματικού σχεδιασμού, ο οποίος συνοδεύεται από διάγραμμα ροής και εν συνεχεία ακολουθεί η περιγραφή των σταδίων αυτών.

Το πείραμα αποτελείται από:

- Ένα επίπεδο εμβολιασμού (7.0 log CFU / g)
- 3 μέρες δειγματοληψίας: 0^η, 1^η, 20^η
- Δύο θερμοκρασίες κατάψυξης (-16 °C, -28 °C)
- Δύο ποσοστά λίπους (0 %, 30 %)
- Δύο ποσοστά NaCl (0 %, 2.5 %)
- Δύο πάχη (1.5cm, 3cm)
- Δύο θερμοκρασίες ψησίματος (65 °C, 71 °C)

Συσκευασμένα κομμάτια βόειου κρέατος (3 kg το καθένα) τεμαχίστηκαν και παρασκευάστηκε κιμάς μέσω κιμαδομηχανής. Ακολούθησε η ζύγιση 500 g βόειου κιμά και η τοποθέτηση του σε αποστειρωμένες σακούλες. Κάθε σακούλα των 500 g ενοφθαλμίστηκε με ποσότητα 5 ml εμβολίου με σκοπό την επίτευξη των επιπέδων 7.0 CFU / g υπό ασηπτικές συνθήκες. Σχηματίστηκαν μπιφτέκια τα οποία υποβλήθηκαν σε μικροβιακή ανάλυση αμέσως μετά το σχηματισμό τους και μπιφτέκια τα οποία υποβλήθηκαν σε θερμική καταπόνηση και έπειτα πραγματοποιήθηκε σε αυτά μικροβιακή ανάλυση. Τα δείγματα συντηρούνταν στους -16 °C και στους -28 °C και οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν τη 0^η, την 1^η και την 20^η μέρα.

Εικόνα 2.1.1 Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας



2.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΟΛΙΟΥ

Για την προετοιμασία του εμβολίου χρησιμοποιήθηκε μίγμα τριών διαφορετικών στελεχών του μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (Πίνακας 2.2.1). Οι καθαρές καλλιέργειες συντηρούνταν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptic Soy Broth (TSB, Biolife - 4021552) + 20 % γλυκερόλης στους -22°C στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πίνακας 2.2.1 Στελέχη του μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία του εμβολίου

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 12079	B15	Κόπρανα ανθρώπου
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 13125	B16	Άγνωστη
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 13127	B18	Άγνωστη

Πριν τον ενοφθαλμισμό του μικροοργανισμού, πραγματοποιήθηκαν δύο αναζωογονήσεις των 3 στελεχών του υπό ασηπτικές συνθήκες με σκοπό την ανάκτηση της ζωτικότητας τους. Η αναζωογόνηση διαρκεί 18 - 24 ώρες. Στην πρώτη αναζωογόνηση παραλήφθηκε 0,1 ml από κάθε ένα από τα 3 στελέχη και αιωρήθηκε αντίστοιχα σε 10 ml αποστειρωμένου TSB. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση των διαλυμάτων για μερικά δευτερόλεπτα σε αναδευτήρα Vortex και έπειτα επώαση στους 37 °C για 24 ώρες. Ακολούθησε δεύτερη αναζωογόνηση κατά την οποία 1 ml από κάθε διάλυμα αιωρήθηκε παρομοίως στην αντίστοιχη αποστειρωμένη κωνική που περιείχε 100 ml TSB και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 18 ώρες.

Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση των ανανεωμένων κυττάρων στις 3400 στροφές / λεπτό (rpm) για 10 λεπτά στους 4 °C με σκοπό την ανάκτηση της βιομάζας τους. Ακολούθησε ο διπλός καθαρισμός της ανακτηθείσας βιομάζας, με προσθήκη 100 ml ισοτονικού διαλύματος Ringer και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Τέλος, αφού

έγινε παραλαβή της ποσότητας του εμβολίου από κάθε στέλεχος, τα στελέχη αναμείχθηκαν σε αποστειρωμένο περιέκτη (DURAN) χωρητικότητας 100 ml. Το μίγμα αυτό αποτέλεσε το τελικό εμβόλιο. Η παραπάνω διαδικασία έλαβε χώρα εντός θαλάμου νηματικής ροής (Laminar flow) υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Συσκευασμένα κομμάτια βόειου κρέατος (3 kg το καθένα) παρελήφθησαν στον εργαστηριακό χώρο τα οποία κάτω από ασηπτικές συνθήκες τεμαχίστηκαν και παρασκευάστηκε κιμάς μέσω κιμαδομηχανής (Kenwood MG510, China). Όλα τα εξαρτήματα της μηχανής είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί. Στόχος ήταν η επίτευξη του χαμηλότερου δυνατού αρχικού μικροβιακού φορτίου στον υπό εξέταση κιμά. Για τον σχηματισμό των δειγμάτων ο κιμάς ήταν είτε άπαχος με 6 - 7 % λίπος είτε περιελάμβανε επιπλέον 30 % λίπος. Όσον αφορά την προσθήκη NaCl, ο κιμάς είτε περιείχε 2.5 % NaCl είτε καθόλου. Το λίπος ζυγίζοταν ξεχωριστά και στη συνέχεια πέρναγε για δεύτερη φορά από την κιμαδομηχανή μαζί με τον κιμά με σκοπό την καλύτερη ομοιογένεια του κιμά. Εν συνεχεία γινόταν η ζύγιση 500 gr βόειου κιμά σε αποστειρωμένες σακούλες. Μετά το τέλος του ζυγίσματος, οι σακούλες φυλάσσονταν στον καταψύκτη στους -22 °C. Μία μέρα πριν τη 0^η μέρα, οι σακούλες με το βόειο κιμά τοποθετούνταν στο ψυγείο με σκοπό να ξεπαγώσουν και να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό των μπιφτεκιών. Τη 0^η μέρα του πειράματος, κάθε σακούλα των 500 g ενοφθαλμίστηκε με ποσότητα 5 ml εμβολίου με σκοπό την επίτευξη των επιπέδων 7.0 CFU / g υπό ασηπτικές συνθήκες και ακολούθησε χειρωνακτική μάλαξη για 5 λεπτά, ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιογένεια των εμβολιασμένων δειγμάτων. Η κατάλληλη ποσότητα NaCl προστέθηκε λίγο πριν τον εμβολιασμό με σκοπό να μην δεσμευτεί η ενυπάρχουσα υγρασία του κιμά και να είναι ίδιος ο κιμάς τόσο στα δείγματα με NaCl όσο και στα χωρίς. Έπειτα οι σακούλες των 500 g τοποθετήθηκαν στους 4 °C για 15 λεπτά με σκοπό την καλύτερη προσκόλληση των κυττάρων. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν μπιφτεκία των 70 g και 120 g και διαστάσεων 1.5 και 3 cm αντίστοιχα με τη βοήθεια αναλυτικού ζυγού καθώς και με τη βοήθεια μεταλλικής

στεφάνης (τσέρκι – cerchi) πραγματοποιήθηκε η μορφοποίηση τους. Στη συνέχεια, τη 0^η μέρα, υποβλήθηκαν σε μικροβιακή ανάλυση τόσο μπιφτέκια χωρίς να υποστούν θερμική επεξεργασία με σκοπό να υπολογιστεί η συγκέντρωση του παθογόνου μικροοργανισμού (μάρτυρες του πειράματος) όσο και μπιφτέκια τα οποία υποβλήθηκαν σε θερμική καταπόνηση με σκοπό να υπολογιστεί η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου. Τα υπόλοιπα δείγματα συντηρήθηκαν στους -16 °C και στους -28 °C και οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν την 1^η και την 20^η μέρα.

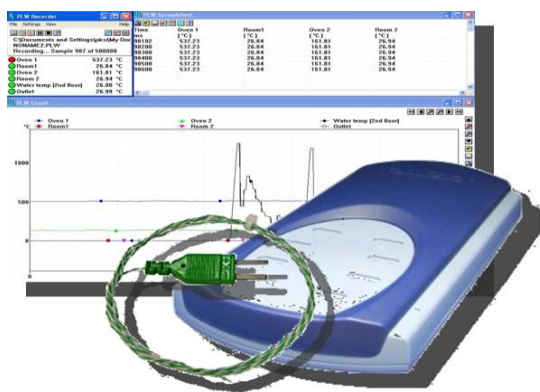


Εικόνες 2.2.1.1 & 2.2.1.2 Σχηματισμός δειγμάτων με την βοήθεια του τσέρκι (cerchi)

2.2.2 ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΟΕΙΩΝ ΜΠΙΦΤΕΚΙΩΝ

Η θερμική επεξεργασία των μπιφτεκίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση οικιακού φούρνου διπλής αντίστασης (Davoline) ο οποίος προθερμαινόταν στους 200 °C. Κατά τη 0^η, 1^η και 20^η μέρα τα δείγματα εκτίθονταν σε θερμική καταπόνηση στους 65 °C ή 71 °C με σκοπό να ερευνηθεί η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού καθώς επίσης και η επίδραση των παραγόντων στην θερμοανθεκτικότητα αυτού. Τη 0^η μέρα τα μπιφτέκια αμέσως μετά το σχηματισμό τους τοποθετήθηκαν για ψήσιμο. Τα κατεψυγμένα μπιφτέκια της 1^{ης} και της 20^{ης}

μέρας τοποθετήθηκαν κατευθείαν για ψήσιμο χωρίς να υποστούν απόψυξη. Για τη μέτρηση των μεταβολών της θερμοκρασίας κατά την θερμική επεξεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν θερμοζεύγη τύπου K, τα οποία προσαρμόστηκαν στα μπιφτεκία από την πλαϊνή πλευρά στο γεωμετρικό τους κέντρο, και καταγραφικό θερμοκρασίας (Pico-PP222) συνδεδεμένο με υπολογιστή. Για τα κατεψυγμένα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε δραπενοκατσάβιδο BLACK & DECKER με σκοπό να επιτευχθούν τρύπες στην πλαϊνή πλευρά τους έτσι ώστε να εισχωρήσουν στο γεωμετρικό κέντρο τα θερμοζεύγη και να πραγματοποιηθεί η επιθυμητή θερμική επεξεργασία των δειγμάτων στους 65 °C ή 71 °C. Κατά το ψήσιμο των μπιφτεκιών πραγματοποιήθηκε γύρισμα στους 33 °C για την αποφυγή της αμαύρωσης στις επιφάνειες των δειγμάτων.



Εικόνες 2.2.2.1 & 2.2.2.2 Χρήση καταγραφικού θερμοκρασίας και οικιακού φούρνου για την θερμική επεξεργασία των δειγμάτων

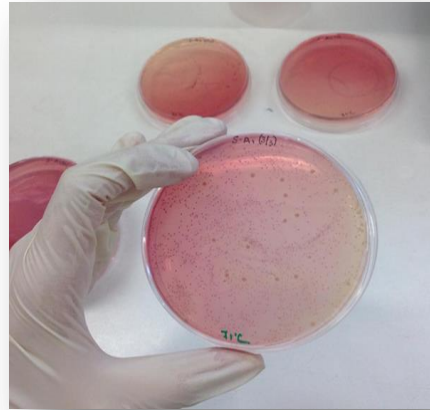
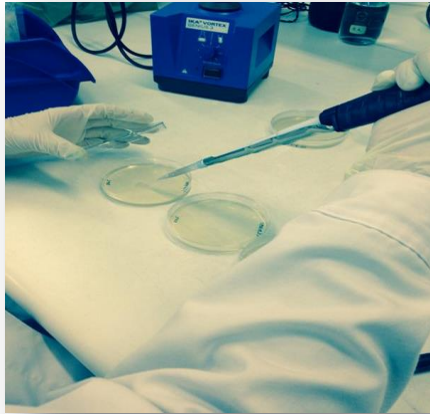
2.2.3 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ – ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αμέσως μετά το ψήσιμο, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σακούλα Stomacher που περιείχε 100 ή 170 ml παγωμένου ισοτονικού διαλύματος Ringer για τα δείγματα των

70 και 120 g αντίστοιχα, με σκοπό την άμεση πτώση της θερμοκρασίας τους. Έπειτα, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο ζυγό και προσδιορίστηκε η απώλεια βάρους τους κατά την θερμική επεξεργασία. Ακολούθησε η προσθήκη ισοτονικού διαλύματος Ringer όπου ήταν απαραίτητο με σκοπό την επίτευξη αραιώσεως 1:3. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε σε συσκευή ομογενοποιητή (Stomacher 400 CIRCULATOR) για 60 δευτερόλεπτα.

2.2.4 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

Η καταμέτρηση του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης των κυττάρων σε TSA + 0.6 % Yeast Extract. Ανάλογα με την επιθυμητή αραιώση ο αντίστοιχος όγκος (0.1 ml ή 1 ml) τοποθετήθηκε στην επιφάνεια του στερεοποιημένου θρεπτικού υποστρώματος και πραγματοποιήθηκε ομοιόμορφη διασπορά (εξάπλωση) του βακτηριακού αιωρήματος σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Έπειτα έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες και μετά προστέθηκε ποσότητα των 12 ml από τον επιλεκτικό παράγοντα Sorbitol McConkey agar. Ο επιλεκτικός παράγοντας προστέθηκε με σκοπό να επιτραπεί η ανάκτηση μόνο των κυττάρων του *E. coli* O157:H7 και όχι άλλων μικροοργανισμών. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C σε επωαστικό θάλαμο (Memert & Sanyo Incubator) για 24 ώρες (Juneja, 2008).



Εικόνες 2.2.4.1 & 2.2.4.2 Επιφανειακή επίστρωση των κυττάρων σε TSA και έπειτα προσθήκη του επιλεκτικού παράγοντα Sorbitol McConkey agar.

2.3 ΠΡΟΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

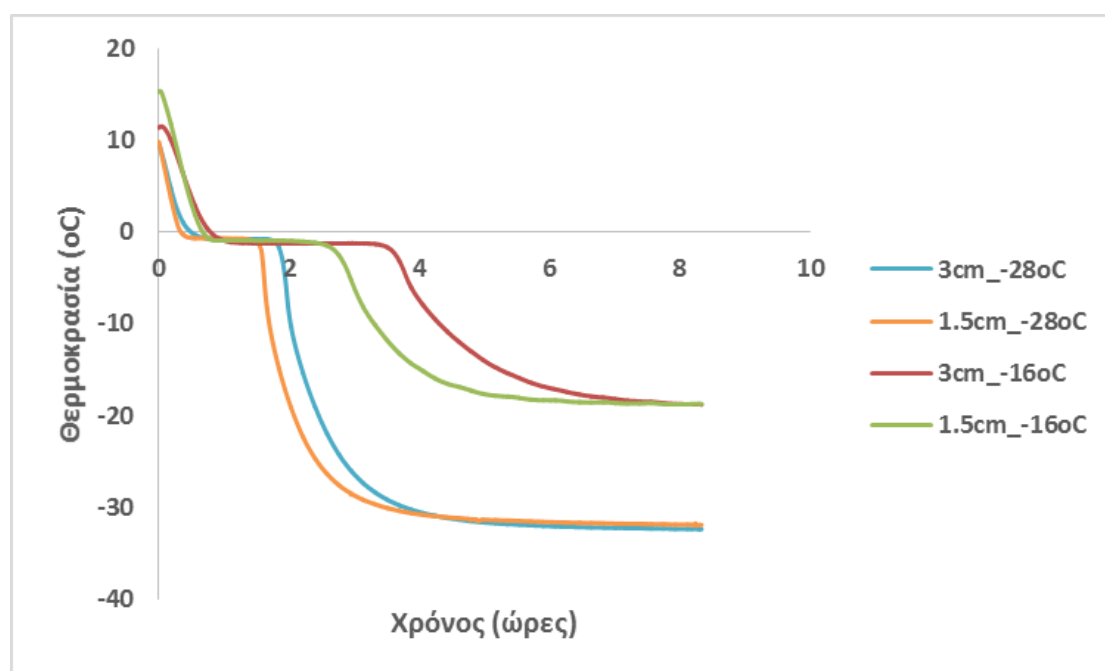
Για να μελετηθεί η επίδραση των παραγόντων του πειράματος στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7, πραγματοποιήθηκε μία σειρά προπειράματων με σκοπό να καταλήξουμε στους τελικούς παράγοντες.

2.3.1 1^{ος} ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Στον 1^ο πειραματικό σχεδιασμό, σχηματίστηκαν δείγματα των 1.5 και 3 cm. Συντηρήθηκαν στην κατάψυξη σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους -16 °C και στους -28 °C. Για τη μέτρηση των μεταβολών της θερμοκρασίας κατά την κατάψυξη

των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν θερμοζεύγη τύπου K τα οποία προσαρμόστηκαν στα μπιφτέκια πριν από την κατάψυξη τους από την πλαϊνή πλευρά στο γεωμετρικό τους κέντρο, καθώς επίσης και καταγραφικό θερμοκρασίας (Pico-PP222) συνδεδεμένο με υπολογιστή. Σκοπός ήταν η αξιολόγηση διαφορών του ρυθμού κατάψυξης.

2.3.1.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 1^{ου} ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ



Διάγραμμα 2.3.1.2.1 Η επίδραση της κατάψυξης στα δείγματα

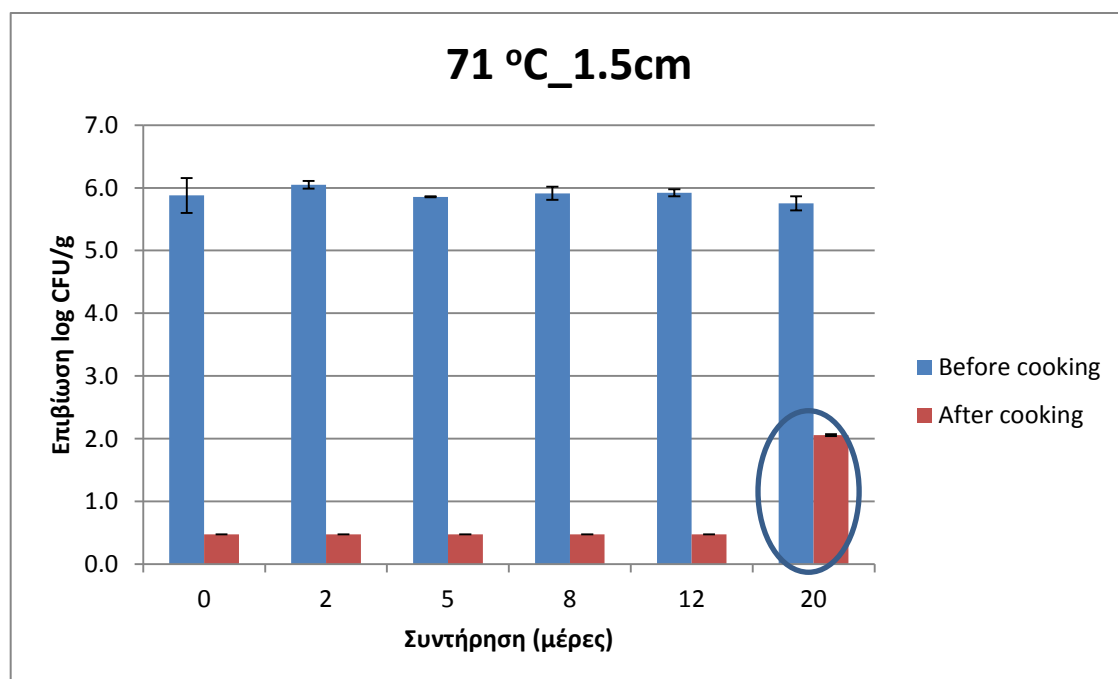
Σύμφωνα με το διάγραμμα (Διάγραμμα 2.3.1.2.1), η διαφορετική θερμοκρασία κατάψυξης οδήγησε σε διαφορετικό ρυθμό κατάψυξης και διαφορετική διάρκεια φάσης της λανθάνουσας θερμότητας. Παρατηρείται ότι τα δείγματα τόσο των 1.5 cm όσο και των 3 cm που είχαν συντηρηθεί στους -28°C (ταχύς ρυθμός κατάψυξης) καταψύχθηκαν πιο γρήγορα συγκριτικά με αυτά που είχαν συντηρηθεί στους -16°C (βραδύς ρυθμός κατάψυξης). Επομένως κρίθηκε σημαντικό στο πείραμα η

συντήρηση των δειγμάτων να πραγματοποιηθεί σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες κατάψυξης.

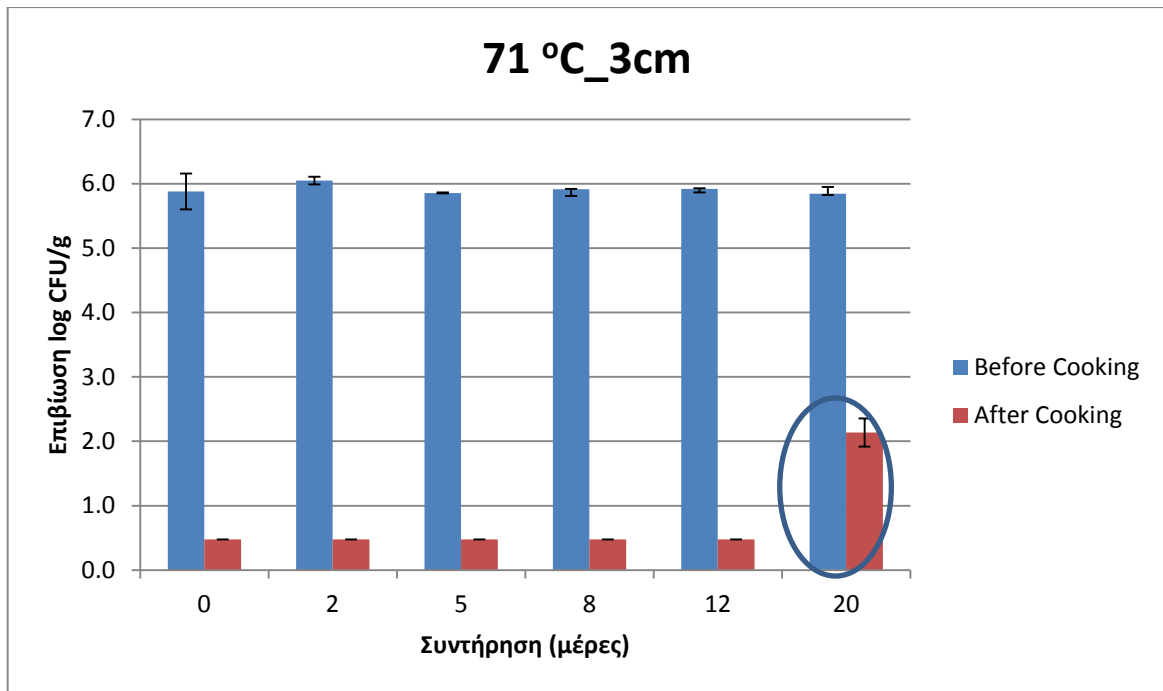
2.3.2 2^{ος} ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Στον 2^ο πειραματικό σχεδιασμό, σχηματίστηκαν δείγματα των 1.5 και 3 cm τα οποία υποβλήθηκαν σε θερμική επεξεργασία. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τη 0^η, 2^η, 5^η, 8^η, 12^η και 20^η μέρα με σκοπό να εντοπιστεί το σημείο στο οποίο αλλάζει η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου. Τα δείγματα συντηρούνταν στους -22 °C.

2.3.2.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 2^{ου} ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ



Διάγραμμα 2.3.2.1.1 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων 1.5 cm στους 71 °C



Διάγραμμα 2.3.2.1.2 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων 3 cm στους 71 °C

Όπως παρατηρείται (Διαγράμματα 2.3.2.1.1 & 2.3.2.1.2) το σημείο στο οποίο αλλάζει η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου είναι η 20^η μέρα κατάψυξης. Για το τελικό πείραμα επιλέξαμε 3 ημέρες δειγματοληψίας:

- 0^η μέρα: Σκοπός είναι να μελετηθεί η συμπεριφορά του παθογόνου στον φρέσκο επιμολυσμένο βόειο κιμά.
- 1^η μέρα: Σκοπός είναι να μελετηθεί η συμπεριφορά του παθογόνου ο οποίος έχει υποστεί καταπόνηση σε μίας μικρής διάρκειας κατάψυξη που θα συγκριθεί με την 20^η μέρα κατάψυξης η οποία αποτελεί τη μεγάλη διάρκειας κατάψυξη.
- 20^η μέρα: Σκοπός είναι να μελετηθεί η συμπεριφορά του παθογόνου ο οποίος έχει υποστεί καταπόνηση σε μιας μεγάλης διάρκειας κατάψυξη. Στο σημείο αυτό θα εντοπιστεί η επίδραση των διαφόρων παραγόντων στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Σκοπός ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της κατάψυξης στα ενοφθαλμισμένα με *E. coli* O157:H7 δείγματα βόειου κιμά σε μιας μικρής διάρκειας κατάψυξη (1^η μέρα κατάψυξης) καθώς και σε μιας παρατεταμένης διάρκειας κατάψυξη (20^η μέρα κατάψυξης). Τα αποτελέσματα της έρευνας απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα και θα αναλυθούν ξεχωριστά για κάθε θερμοκρασία θερμικής επεξεργασίας (65 °C και 71 °C).

Αρχικά παρατίθενται τα διαγράμματα (3.1.1.1 και 3.1.1.2) που περιγράφουν τη μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 σε μπιφτέκια από βόειο κιμά διαφορετικής σύστασης κατά τη συντήρησή τους από τη 0^η μέρα όπου και προετοιμάστηκαν έως και την 20^η. Στη συνέχεια παρατίθενται τα διαγράμματα επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού μετά την θερμική επεξεργασία (3.2.1.1, 3.2.1.3.1, 3.2.2.1, 3.2.2.2, 3.2.3.4.1, 3.2.3.4.2, 3.3.1.1, 3.3.2.1, 3.3.2.2, 3.3.3.1, 3.3.3.2). Τέλος παρατίθενται το διάγραμμα (4.1.1) που δείχνει την επίδραση της κατάψυξης στα δείγματα (-16 °C και -28 °C) και το διάγραμμα (4.2.1) που περιγράφει τις θερμοκρασίες που ακολουθούν τα δείγματα από τη στιγμή που βρίσκονται ωμά μέχρι τη στιγμή που υπέστησαν θερμική επεξεργασία και πως οι θερμοκρασίες αυτές επηρεάζουν την θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου. Κάθε διάγραμμα επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού αντιπροσωπεύει όλους τους παράγοντες του πειράματος σε συγκεκριμένη θερμοκρασία συντήρησης και θερμικής επεξεργασίας αντίστοιχα. Πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ όλων των παραγόντων του πειράματος. Από τα διαγράμματα προκύπτει η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης καθώς και η επίδραση της θερμοκρασίας της θερμικής επεξεργασίας σε συνδυασμό με το μέγεθος των δειγμάτων καθώς και την περιεκτικότητά τους σε λίπος και NaCl στην επιβίωση και την θερμοανθεκτικότητα του *E. coli* O157:H7.

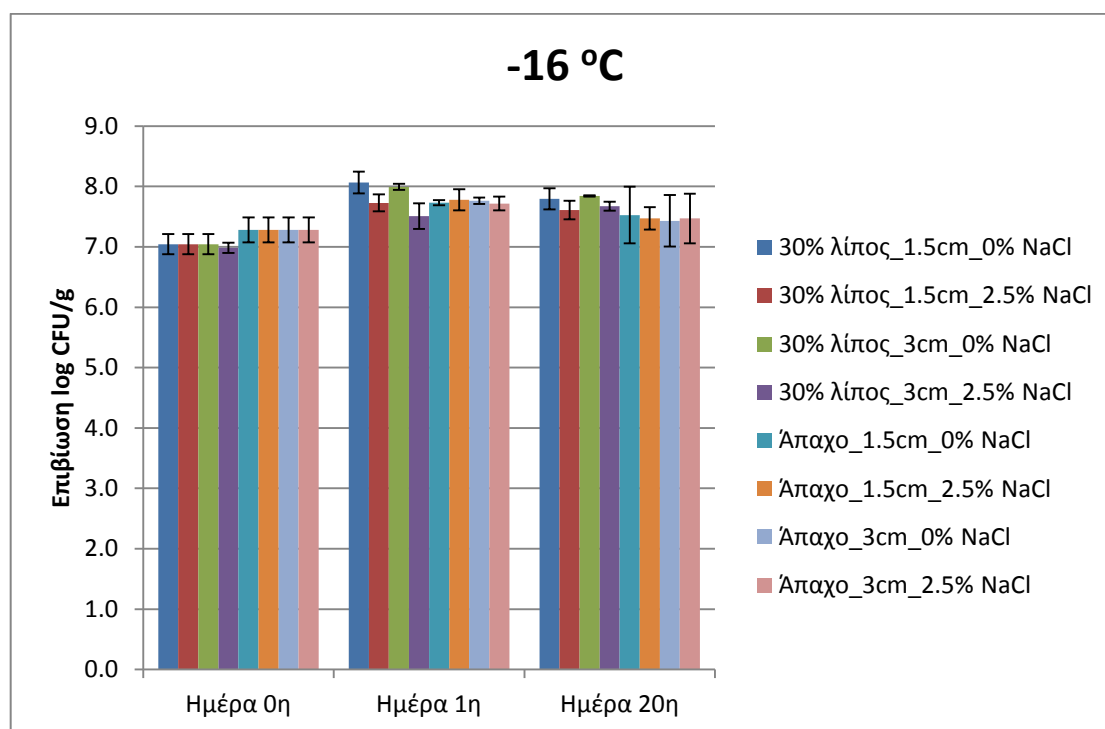
3.1.1 Η ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΨΥΞΗ

Αρχικά ο φρέσκος κιμάς εμβολιάστηκε και σχηματίστηκαν δείγματα διαφορετικής σύστασης και μεγέθους (0^η μέρα). Μόλις σχηματίστηκαν τα δείγματα, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία για να εκτιμηθεί ο πληθυσμός του παθογόνου ο οποίος ανερχόταν στα 7 log CFU / g. Τα υπόλοιπα δείγματα τοποθετήθηκαν στους καταψύκτες για τη συντήρησή τους.

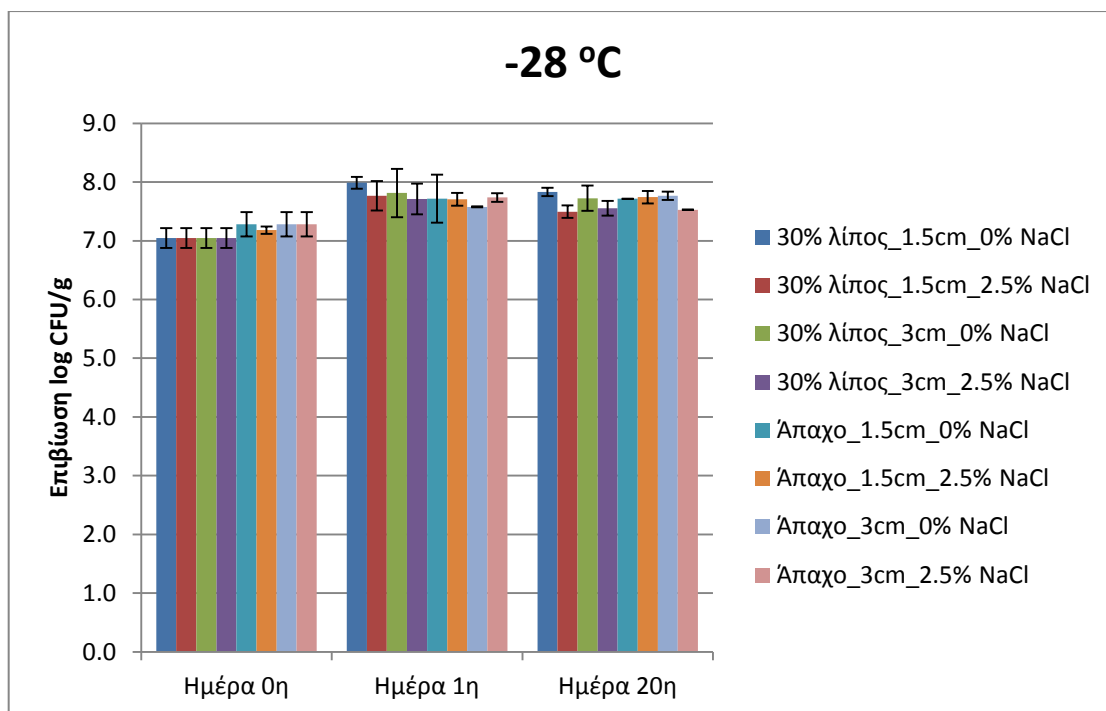
Πιο συγκεκριμένα (Διάγραμμα 3.1.1.1), απεικονίζεται η μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου σε μπιφτέκια διαφορετικής σύστασης κατά τη συντήρησή τους στους -16 °C από τη 0^η έως την 20^η ημέρα συντήρησης. Συγκρίνοντας τη 0^η μέρα με την 1^η μέρα κατάψυξης, τη 0^η μέρα ο πληθυσμός του παθογόνου ανερχόταν στα 7.0 log CFU / g ενώ την 1^η μέρα κατάψυξης ο πληθυσμός του παθογόνου παρουσίασε στατιστικώς σημαντική ($P < 0.05$) αύξηση και συγκεκριμένα στα δείγματα τόσο των 1.5 cm όσο και των 3 cm με την προσθήκη λίπους και χωρίς την προσθήκη NaCl, ο πληθυσμός του παθογόνου ανερχόταν στους 8 λογαριθμικούς κύκλους. Συνεχίζοντας, συγκρίνοντας τη 0^η μέρα με την 20^η μέρα κατάψυξης, παρατηρείται την 20^η μέρα κατάψυξης στατιστικώς σημαντική ($P < 0.05$) αύξηση του πληθυσμού του παθογόνου επίσης στα δείγματα των 1.5 και των 3 cm με την προσθήκη λίπους και χωρίς την προσθήκη NaCl, καθώς ο πληθυσμός του παθογόνου ανερχόταν στους 7.8 λογαριθμικούς κύκλους. Τέλος, συγκρίνοντας την 1^η μέρα με την 20^η μέρα κατάψυξης, δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές ($P > 0.05$) διαφορές στην επιβίωση του παθογόνου. Συνεχίζοντας (Διάγραμμα 3.1.1.2), απεικονίζεται η μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου σε μπιφτέκια διαφορετικής σύστασης και μεγέθους κατά τη συντήρησή τους στους -28 °C από τη 0^η έως και την 20^η μέρα κατάψυξης. Συγκρίνοντας τη 0^η μέρα με την 1^η μέρα κατάψυξης, τη 0^η μέρα ο πληθυσμός του παθογόνου ανερχόταν στα 7.0 log CFU / g ενώ την 1^η μέρα κατάψυξης ο πληθυσμός του παθογόνου παρουσίασε στατιστικώς σημαντική ($P < 0.05$) αύξηση από 0.7 έως 1 λογαριθμικούς κύκλους στα δείγματα με λίπος τόσο των 1.5 cm όσο και των 3 cm, με NaCl και χωρίς την προσθήκη NaCl. Συνεχίζοντας, συγκρίνοντας τη 0^η μέρα με την 20^η μέρα κατάψυξης, την 20^η μέρα παρατηρείται επίσης στατιστικώς σημαντική ($P < 0.05$) αύξηση του πληθυσμού του παθογόνου από 0.6 μέχρι και 0.8 λογαριθμικούς κύκλους στα δείγματα με λίπος των 1.5 cm και των 3 cm με NaCl και χωρίς την προσθήκη NaCl. Τέλος, συγκρίνοντας την 1^η με την 20^η

μέρα κατάψυξης, δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές ($P > 0.05$) διαφορές στην επιβίωση του παθογόνου.

Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι τόσο στους $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ όσο και στους $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, οι διαφορές μπορεί να είναι στατιστικώς σημαντικές, πρακτικά θεωρείται αδύνατο όμως να υπάρξει αύξηση της επιβίωσης του παθογόνου κατά τη συντήρηση των δειγμάτων στην κατάψυξη. Στις αυξήσεις αυτές την 1^η και την 20^η μέρα, δεν επέδρασε η κατάψυξη καθώς είναι ευρέως γνωστό ότι προκαλεί τραυματισμό των κυττάρων. Πιθανολογούμε ότι ήταν σφάλμα χειρισμού καθώς το πείραμα δεν μπόρεσε να στηθεί γρήγορα λόγω των πολλών δειγμάτων τα οποία έπρεπε να τοποθετηθούν ταυτόχρονα στους καταψύκτες. Αυτό διήρκεσε γύρω στις 4 ώρες επομένως ενδέχεται στο διάστημα αυτό να ευνοήθηκαν οι αυξήσεις αυτές.



Διάγραμμα 3.1.1.1 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου σε μπιφτέκια διαφορετικής σύστασης κατά τη συντήρησή τους από τη 0^η έως την 20^η ημέρα κατάψυξης



Διάγραμμα 3.1.1.2 Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου σε μπιφτέκια διαφορετικής σύστασης κατά τη συντήρησή τους από τη 0^η έως την 20^η ημέρα κατάψυξης

3.2 Η ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟΥΣ 65 °C

3.2.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗ 0^η ΜΕΡΑ

Τη 0^η μέρα, μετά τον εμβολιασμό του βόειου κιμά και έπειτα από τον σχηματισμό των μπιφτεκίων, πραγματοποιήθηκε θερμική επεξεργασία σε δείγματα που μόλις σχηματίστηκαν με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση του παθογόνου μικροοργανισμού στα μπιφτέκια διαφορετικής σύστασης και μεγέθους. Πιο συγκεκριμένα η 0^η μέρα (Διάγραμμα 3.2.1.1), θεωρείται η πιο ανθεκτική μέρα και παρατηρούνται οι μικρότερες μειώσεις στον πληθυσμό του παθογόνου μικροοργανισμού λόγω του ότι δεν έχει προλάβει να επιδράσει κανένας παράγοντας του πειράματος και η μόνη καταπόνηση του μικροοργανισμού είναι η θερμική επεξεργασία.

3.2.1.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΛΙΠΟΥΣ

Όσον αφορά τα δείγματα που υπέστησαν θερμική επεξεργασία (Διάγραμμα 3.2.1.1.1), συγκρίνοντας εκείνα στα οποία προστέθηκε 30 % λίπος με εκείνα που ήταν άπαχα, παρατηρείται ότι σε όλα τα δείγματα με λίπος η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού μετά την θερμική επεξεργασία ήταν μεγαλύτερη, με την μεγαλύτερη επιβίωση του παθογόνου να λαμβάνει χώρα στα δείγματα των 1.5 cm χωρίς την προσθήκη NaCl που ανερχόταν στους 6.7 λογαριθμικούς κύκλους. Ο παράγοντας λίπος επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$) στη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου. Το λίπος μπορεί να προστατεύσει τον παθογόνο από την θερμική επεξεργασία και να συμβάλλει στην επιβίωση του (Luchansky *et al.*, 2012). Αυτό συμβαίνει λόγω της ευκολότερης διείσδυσης του παθογόνου στις πιο λιπαρές τροφές σε σύγκριση με τις λιγότερο λιπαρές (Juneja *et al.*, 1997 και Luchansky *et al.*, 2012). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν και με άλλες σχετικές μελέτες όπως για παράδειγμα εκείνη όπου η θερμική αδρανοποίηση του *E. coli* O157:H7 σε κατεψυγμένα μπιφτέκια ήταν πιο αποτελεσματική στα μπιφτέκια που είχαν χαμηλό ποσοστό λίπους σε σχέση με αυτά που είχαν υψηλό ποσοστό λίπους (70:30). Το υψηλό ποσοστό λίπους φανέρωσε μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα στο *E. coli* O157:H7 (Luchansky *et al.*, 2013). Επιπλέον και σε άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε μπιφτέκια από βόειο κρέας, το υψηλό ποσοστό λίπους οδήγησε σε υψηλότερες τιμές D (D values) (Line, 1991 and Huang *et al.*, 1992).

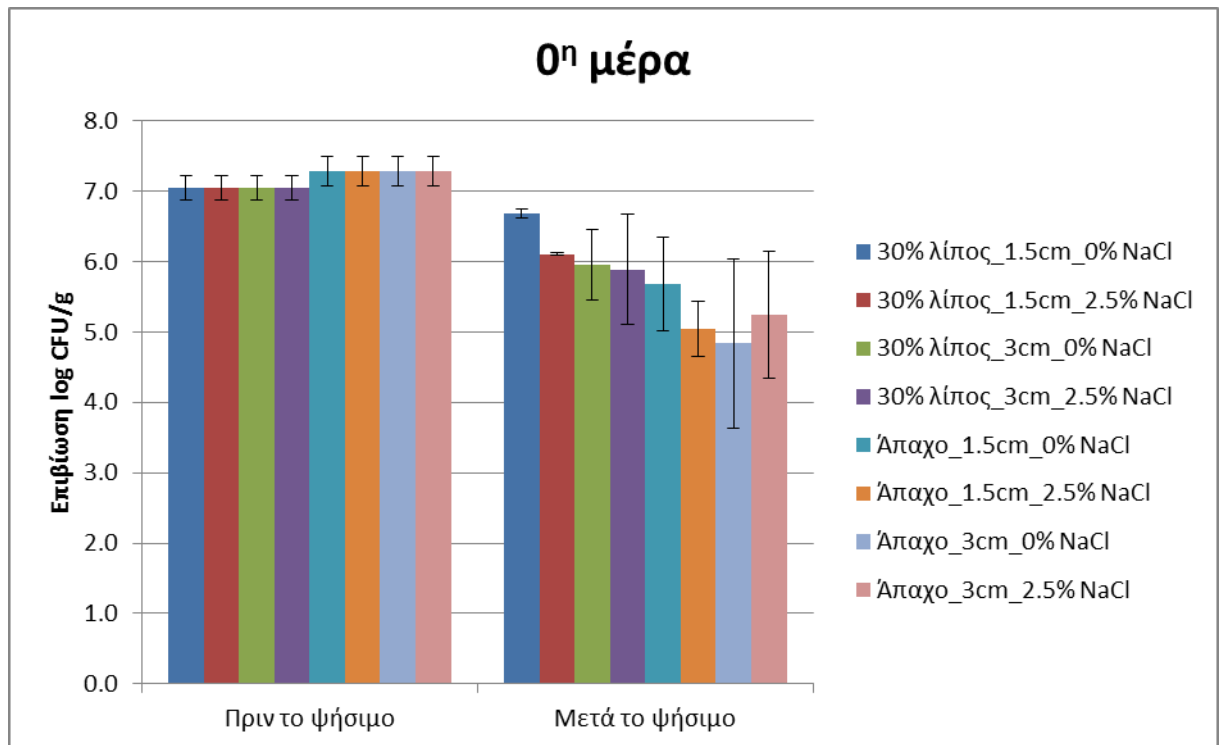
3.2.1.2 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NaCl

Εν αντιθέση με τον παράγοντα λίπος, ο παράγοντας NaCl δεν επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$) στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου (Διάγραμμα 3.2.1.3.1). Παρόλο που υπάρχουν μελέτες στις οποίες έχει διερευνηθεί η σύνδεση του NaCl με τη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου, στην παρούσα μελέτη το ποσοστό 2.5 % το οποίο προσομοιάζει την περιεκτικότητα σε NaCl που έχει ένα τρόφιμο έτοιμο προς κατανάλωση, δεν ήταν ικανό να παρέχει προστασία στον παθογόνο μικροοργανισμό. Από ότι φαίνεται το ποσοστό 2.5 % ήταν πολύ μικρό για να συμβάλλει στην προστασία του παθογόνου. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με άλλη έρευνα στην οποία ο συνδυασμός του NaCl σε ποσοστό 3 % με την θερμική επεξεργασία στους 55 °C, δεν έδωσε σημαντική διαφορά στη μείωση του *E. coli* O157:H7 σε εργαστηριακά μέσα (Sun-Young Lee and Dong-Hyun Kang, 2009).

Τα δεδομένα αυτά τεκμηριώνονται και από άλλη έρευνα στην οποία μελετήθηκε η επίδραση τόσο του ποσοστού 3 % όσο και του 8,5 % NaCl σε συνδυασμό με την θερμική επεξεργασία και έδειξε ότι το ποσοστό 3 % δεν ήταν ικανό να αυξήσει την θερμοανθεκτικότητα του *E. coli* O157:H7 εν αντιθέση με το 8,5 % NaCl (Blackburn *et al.*, 1997). Παρατηρείται λοιπόν αλλαγή στη συμπεριφορά του NaCl όταν συνδυάζεται με την θερμική επεξεργασία καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του, από ανασταλτικός παράγοντας έχει τη δυνατότητα να προσδώσει θερμική αντίσταση στον παθογόνο.

3.2.1.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΜΕΓΕΘΟΥΣ

Παρομοίως με τον παράγοντα NaCl, τη 0^η μέρα ο παράγοντας μέγεθος δεν προκάλεσε καμία στατιστικώς σημαντική ($P > 0.05$) διαφορά στην επιβίωση του παθογόνου ανεξάρτητα από την περιεκτικότητα σε λίπος και NaCl των δειγμάτων (Διάγραμμα 3.2.1.3.1).

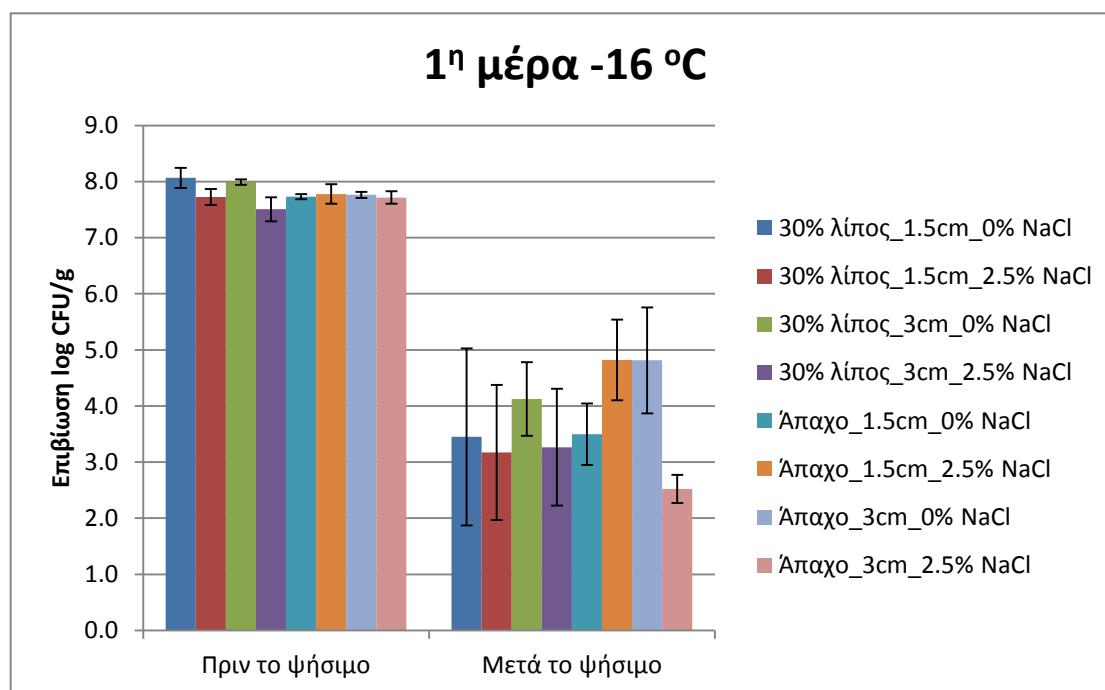


Διάγραμμα 3.2.1.3.1 Η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού μετά την θερμική επεξεργασία στους 65 °C τη 0^η μέρα

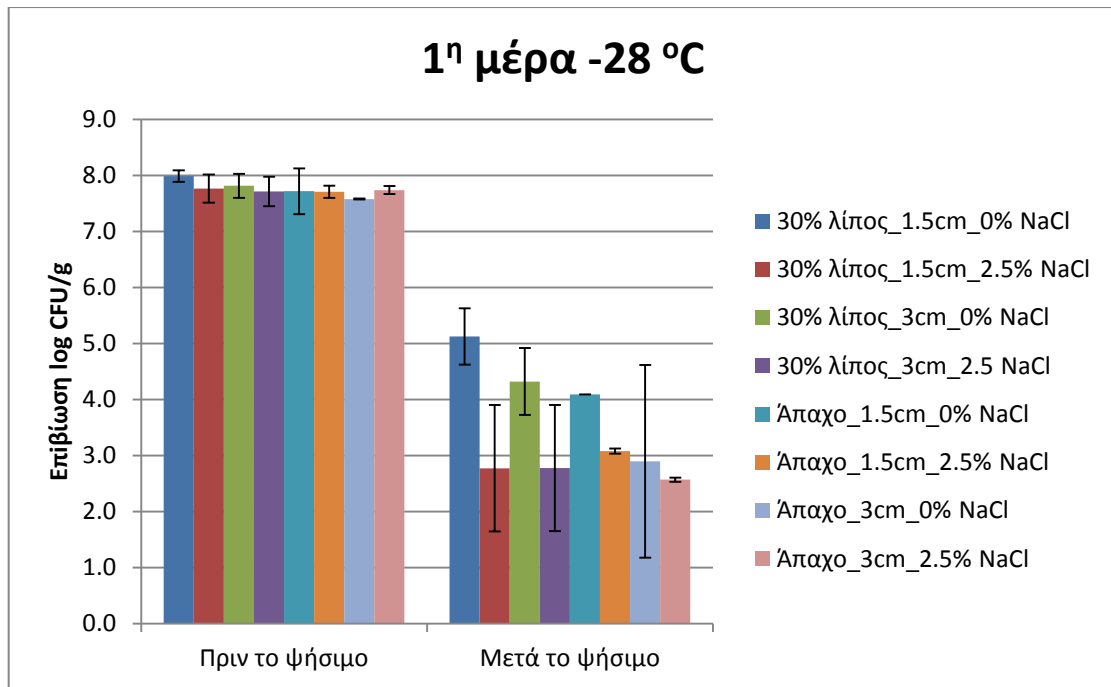
3.2.2 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΝ 1^η ΜΕΡΑ

Μετά από 24 ώρες στους -16 °C και στους -28 °C, η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μειώθηκε σημαντικά συγκριτικά με τη 0^η μέρα (φρέσκος βόειος κιάς). Όσον αφορά τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους -16 °C (Διάγραμμα 3.2.2.1), ο παράγοντας λίπος δεν επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$). Το NaCl επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$) και συγκεκριμένα στα άπαχα δείγματα των 3 cm παρατηρείται ότι στα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί NaCl, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μικρότερη κατά δύο λογαριθμικούς κύκλους συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα στα οποία δεν είχε προστεθεί NaCl. Όσον αφορά το μέγεθος των δειγμάτων και συγκεκριμένα στα άπαχα δείγματα με προσθήκη NaCl, στα δείγματα των 1.5 cm η επιβίωση του παθογόνου ήταν στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$) μεγαλύτερη κατά 3 λογαριθμικούς κύκλους συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα των 3 cm. Όσον αφορά τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους -28 °C (Διάγραμμα 3.2.2.2), το λίπος επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$) και συγκεκριμένα στα

δείγματα με λίπος των 1.5 cm και χωρίς την προσθήκη NaCl η επιβίωση του παθογόνου ήταν μεγαλύτερη κατά έναν λογαριθμικό κύκλο συγκριτικά με τα αντίστοιχα άπαχα δείγματα. Επιπλέον και στα δείγματα με λίπος των 3 cm χωρίς την προσθήκη NaCl, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μεγαλύτερη κατά έναν λογαριθμικό κύκλο συγκριτικά με τα αντίστοιχα άπαχα δείγματα. Όσον αφορά το NaCl επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$) στη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου και όχι στην θερμοανθεκτικότητα του. Συγκεκριμένα, στα δείγματα με NaCl των 1.5 cm με λίπος, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μικρότερη κατά δύο λογαριθμικούς κύκλους σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς NaCl. Επίσης στα δείγματα με NaCl των 3 cm με λίπος, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μικρότερη κατά έναν λογαριθμικό κύκλο σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς NaCl. Τέλος, στα δείγματα με NaCl των 1.5 cm χωρίς λίπος η επιβίωση του παθογόνου ήταν μικρότερη κατά έναν λογαριθμικό κύκλο σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς NaCl. Όσον αφορά το μέγεθος δεν επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$) στη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου.



Διάγραμμα 3.2.2.1 Η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού μετά την θερμική επεξεργασία στους 65 °C την 1^η μέρα



Διάγραμμα 3.2.2.2 Η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού μετά την θερμική επεξεργασία στους 65 °C την 1^η μέρα

3.2.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΝ 20^η ΜΕΡΑ

Σε αντίθεση με την 1^η μέρα κατάψυξης την 20^η μέρα κατάψυξης παρατηρείται η προσαρμογή του παθογόνου και η μερική ανάκτηση των κυττάρων. Η παρατεταμένη διάρκεια κατάψυξης οδήγησε σε μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου.

3.2.3.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΛΙΠΟΥΣ

Όσον αφορά τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Διάγραμμα 3.2.3.4.1), το λίπος δεν επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$) στη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου. Όσον αφορά τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Διάγραμμα 3.2.3.4.2), το λίπος επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$) και συγκεκριμένα σε όλα τα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί λίπος, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μεγαλύτερη μέχρι και 2.5 λογαριθμικούς κύκλους συγκριτικά με τα άπαχα δείγματα.

3.2.3.2 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ NaCl

Συγκριτικά με την 1^η μέρα κατάψυξης, την 20^η μέρα κατάψυξης τόσο στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ όσο και στους $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Διαγράμματα 3.2.3.4.1 και 3.2.3.4.2), ο παράγοντας NaCl δεν επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$) στην μείωση του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού καθώς επίσης ούτε στη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητά του.

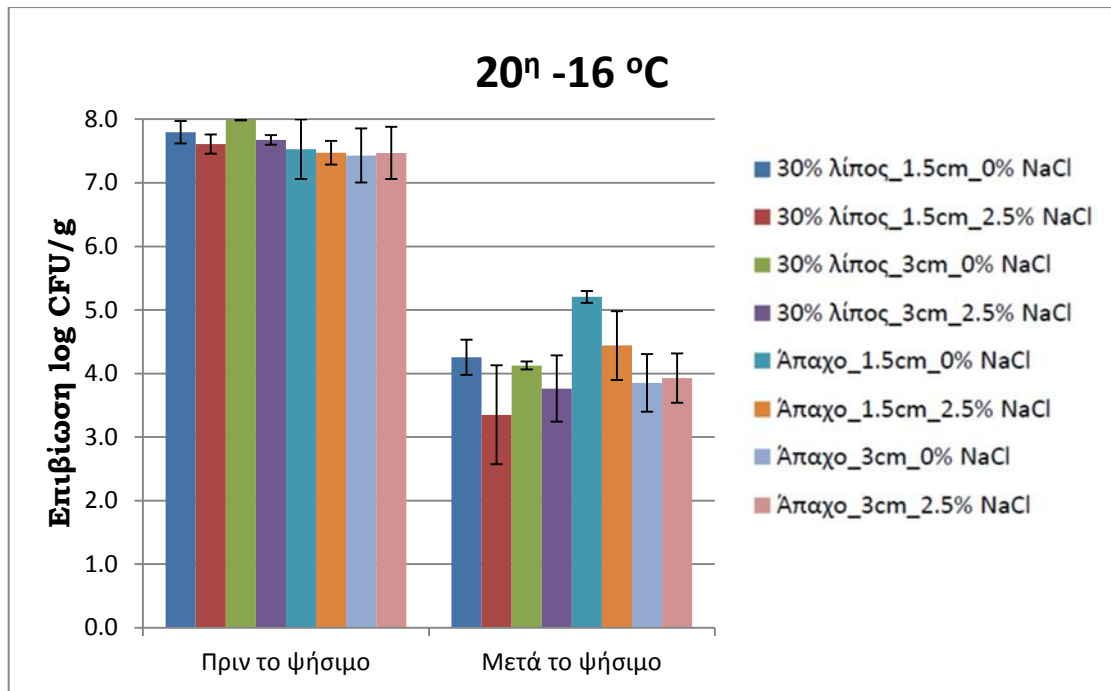
3.2.3.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΜΕΓΕΘΟΥΣ

Όσον αφορά τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$, ο παράγοντας μέγεθος δεν επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$) στη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου. Όσον αφορά τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, ο παράγοντας μέγεθος επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$) και συγκεκριμένα στα δείγματα των 1.5 cm με λίπος και NaCl, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μεγαλύτερη κατά δύο λογαριθμικούς κύκλους συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα των 3 cm. Επίσης στα δείγματα των 1.5 cm με λίπος και χωρίς NaCl, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μεγαλύτερη κατά έναν λογαριθμικό κύκλο συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα των 3 cm.

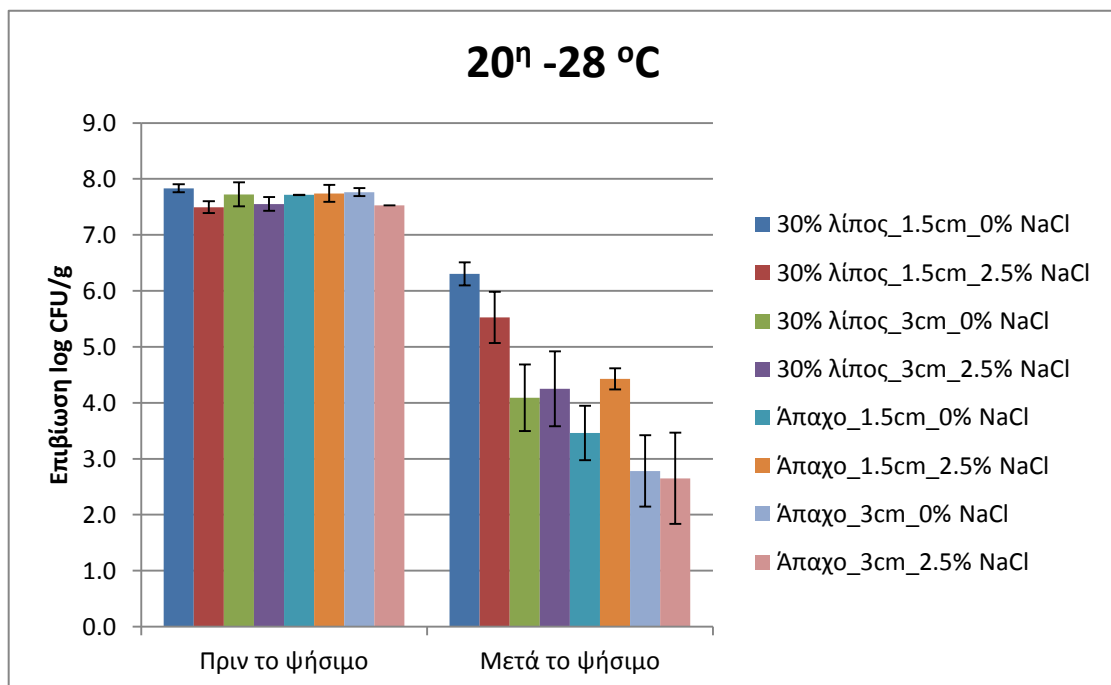
Η επίδραση αυτή του μεγέθους θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα δείγματα των 3 cm στους $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ υπέστησαν μεγαλύτερο διάστημα θερμική επεξεργασία συγκριτικά με εκείνα των 3 cm στους $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$, κάτι που σημαίνει ότι ο παθογόνος εκτέθηκε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε θανατηφόρες θερμοκρασίες και για αυτό παρουσιάζεται μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού. Σύμφωνα με σχετική έρευνα, η οποία πραγματοποιήθηκε σε μπριζόλες από βόειο κρέας διαφορετικού μεγέθους, εμβολιάστηκαν με *E. coli* O157:H7 και υπέστησαν θερμική καταπόνηση, διαπιστώθηκε ότι τα μεγάλα δείγματα (4 cm) υπέστησαν περισσότερο χρόνο θερμική επεξεργασία και σε αυτές υπήρξε μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου συγκριτικά με τις μπριζόλες μικρότερου μεγέθους (1.5 cm). Όσο αυξάνεται το μέγεθος του προϊόντος καθώς επίσης και ο χρόνος για την επίτευξη της επιθυμητής εσωτερικής θερμοκρασίας στόχου, τόσο μεγαλύτερη ήταν η αδρανοποίηση του *E. coli* O157:H7 (Shen *et al.*, 2010).

3.2.3.4 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΚΑΤΑΨΥΞΗΣ

Μετά το πέρας 20 ημερών παρατηρείται ότι η παρατεταμένη διάρκεια κατάψυξης σε συνδυασμό με τον ταχύ ρυθμό κατάψυξης ($-28\text{ }^{\circ}\text{C}$) δύναται να ευνοήσει τη μερική ανάκτηση της θερμοανθεκτικότητας του *E. coli* O157:H7. Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τα δείγματα των 1.5 cm με 30 % λίπος που συντηρήθηκαν στους $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού ήταν 2 λογαριθμικούς κύκλους μεγαλύτερη συγκριτικά με τα δείγματα των 3 cm με 30 % λίπος που συντηρήθηκαν στους $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στον ταχύ ρυθμό κατάψυξης ($-28\text{ }^{\circ}\text{C}$) σχηματίζονται μικροί παγοκρύσταλλοι που τραυματίζουν λιγότερο τα κύτταρα συγκριτικά με τον βραδύ ρυθμό κατάψυξης ($-16\text{ }^{\circ}\text{C}$) όπου σχηματίζονται μεγάλοι παγοκρύσταλλοι με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερος τραυματισμός των κυττάρων.



Διάγραμμα 3.2.3.4.1 Η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού μετά την θερμική επεξεργασία στους 65 °C την 20^η μέρα

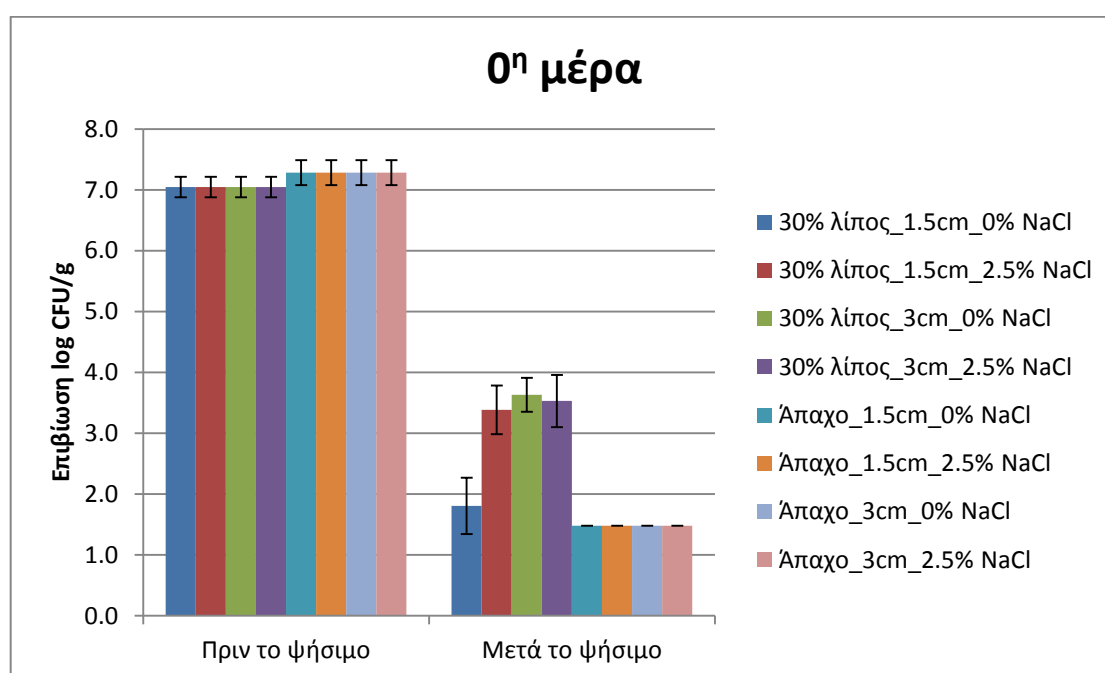


Διάγραμμα 3.2.3.4.2 Η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού μετά την θερμική επεξεργασία στους 65 °C την 20^η μέρα

3.3 Η ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΟΥΣ 71 °C

3.3.1 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗ 0^η ΜΕΡΑ

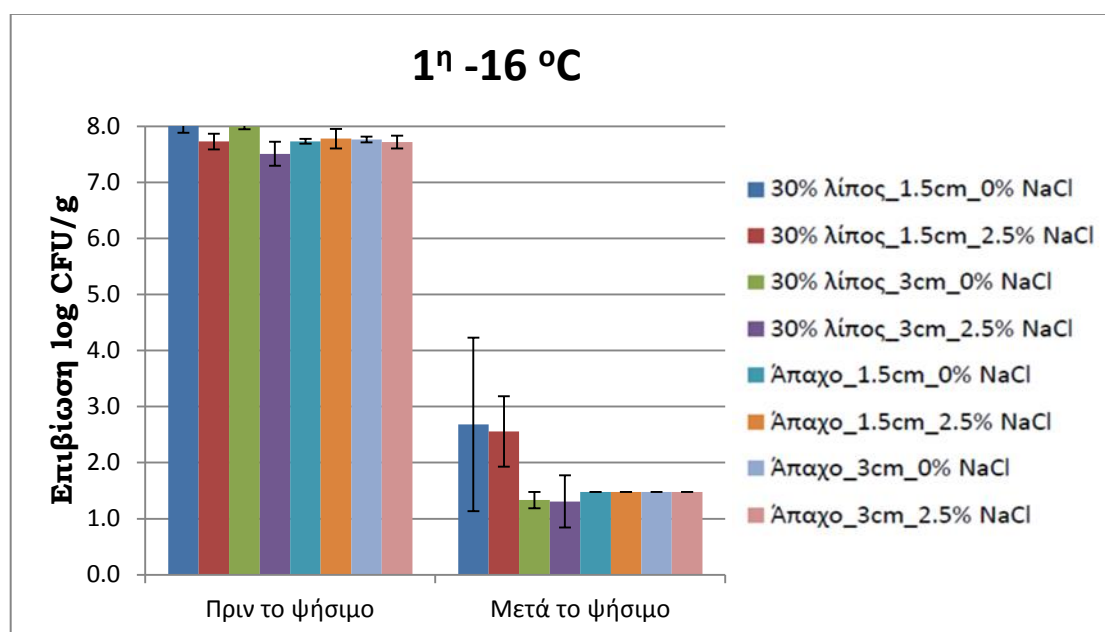
Τη 0^η μέρα, κατά το ψήσιμο στους 71 °C (Διάγραμμα 3.3.1.1), η συμπεριφορά του παθογόνου ως προς την επιβίωση του ήταν παρόμοια με εκείνη όταν το ψήσιμο πραγματοποιούνταν στους 65 °C. Η διαφορά τους όμως ήταν ότι στους 71 °C είχαμε πολύ πιο μικρή επιβίωση συγκριτικά με τους 65 °C και αυτό οφείλεται στη συγκεκριμένη θερμοκρασία που θεωρείται θανατηφόρα για τον παθογόνο. Πιο συγκεκριμένα, τη 0^η μέρα παρατηρείται ότι το λίπος αυξάνει στατιστικώς σημαντικά την επιβίωση του παθογόνου ($P < 0.05$), καθώς σε όλα τα δείγματα με λίπος η επιβίωση ήταν μέχρι και 1.6 λογαριθμικούς κύκλους μεγαλύτερη από εκείνη των άπαχων δειγμάτων. Συνεχίζοντας με τους άλλους παράγοντες, τόσο το NaCl όσο και το μέγεθος των δειγμάτων δεν επέδρασαν στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$).



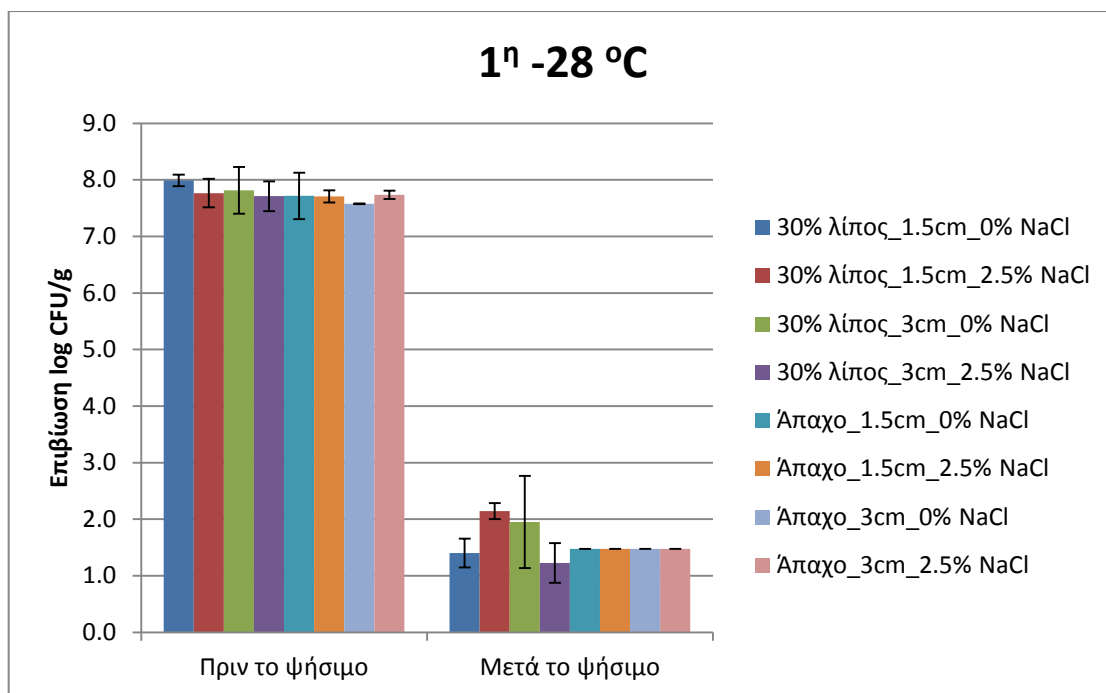
Διάγραμμα 3.3.1.1 Η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού τη 0^η μέρα

3.3.2 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΝ 1^η ΜΕΡΑ

Την 1^η μέρα, όπως στους 65 °C έτσι και στους 71 °C, ο παθογόνος μικροοργανισμός ήταν πιο ευαίσθητος στην θερμική καταπόνηση συγκριτικά με τη 0^η (Διαγράμματα 3.3.2.1, 3.3.2.2). Κανένας από τους παράγοντες δεν επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$) στη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η θερμοκρασία αυτή (71 °C) θεωρείται θανατηφόρα για τον μικροοργανισμό και υπερκαλύπτει τη δράση όλων των παραγόντων.



Διάγραμμα 3.3.2.1 Η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού μετά την θερμική επεξεργασία στους 71 °C την 1^η μέρα

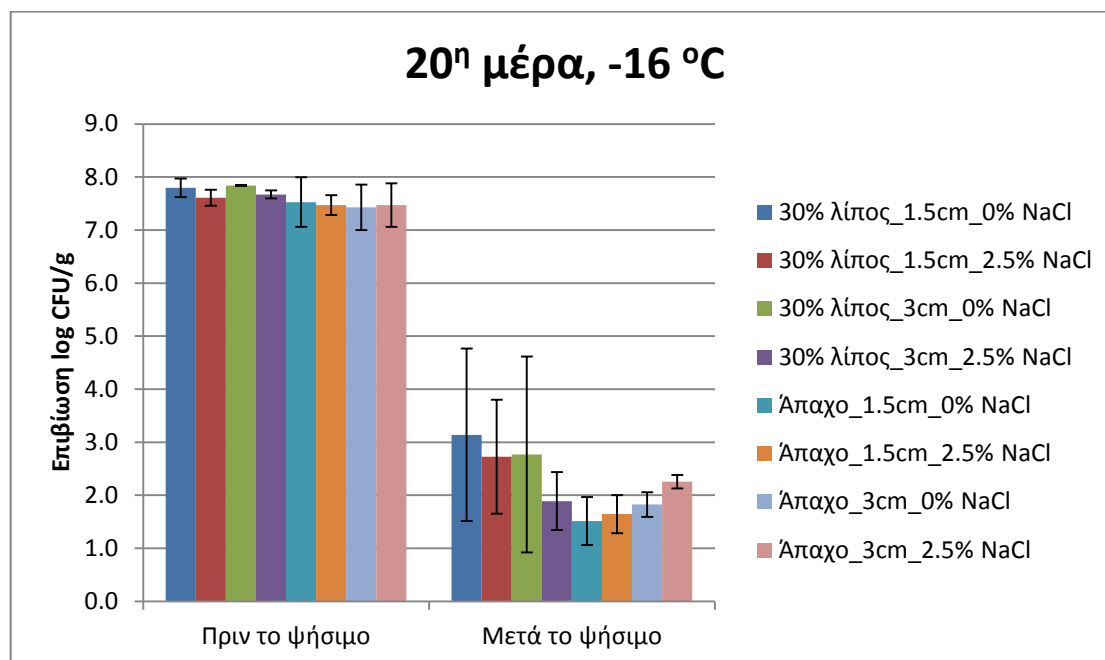


Διάγραμμα 3.3.2.2 Η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού μετά την θερμική επεξεργασία στους 71 °C την 1^η μέρα

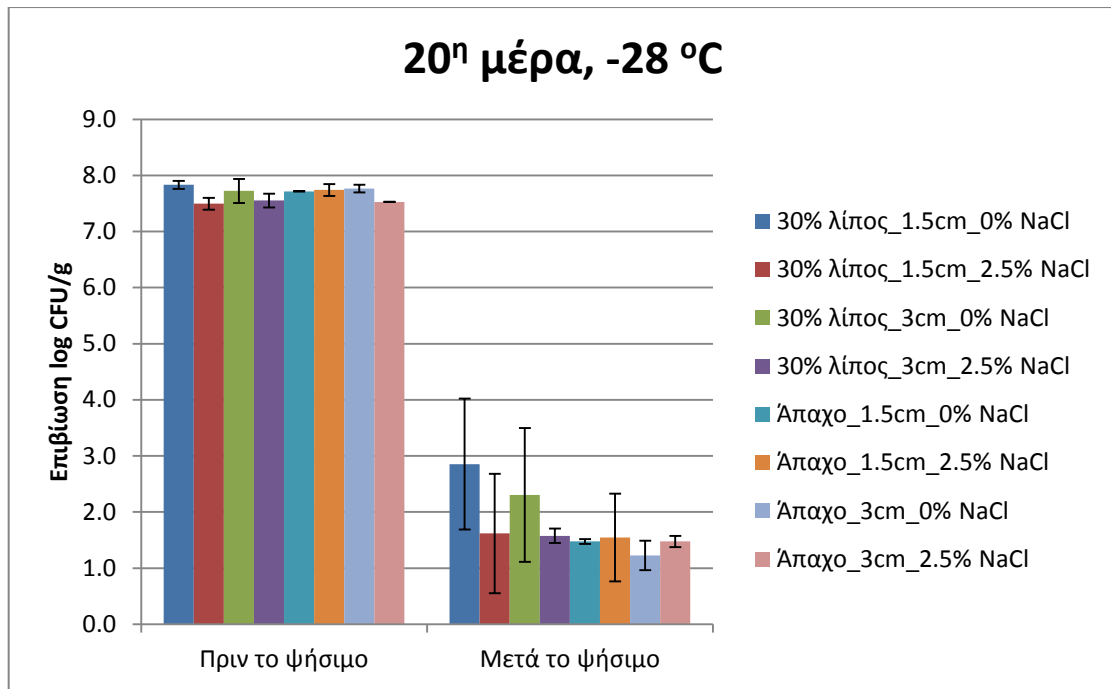
3.3.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΝ 20^η ΜΕΡΑ

Την 20^η μέρα κατάψυξης (Διαγράμματα 3.3.3.1 και 3.3.3.2) η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου αυξήθηκε συγκριτικά με την 1^η μέρα κατάψυξης. Αυτό οφείλεται στην παρατεταμένη διάρκεια κατάψυξης που προσδίδει μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα στον παθογόνο καθώς επίσης και στο γεγονός ότι πιθανών ο μικροοργανισμός να ανέπτυξε μηχανισμούς προσαρμογής στην περιβαλλοντική αλλαγή. Συγκριτικά όμως με τη 0^η μέρα ο παθογόνος ήταν πιο ευαίσθητος. Όσον αφορά τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους -16 °C, το λίπος επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$) στη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου και συγκεκριμένα στα δείγματα με λίπος των 1.5 cm και χωρίς NaCl, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μεγαλύτερη κατά 1.5 λογαριθμικούς κύκλους συγκριτικά με τα αντίστοιχα άπαχα δείγματα. Επίσης στα δείγματα με λίπος των 1.5 cm με NaCl, η

επιβίωση του παθογόνου ήταν μεγαλύτερη κατά 1 λογαριθμικό κύκλο συγκριτικά με τα αντίστοιχα άπαχα δείγματα. Όσον αφορά τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους -28 °C, το λίπος εξίσου επέδρασε στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$) και συγκεκριμένα στα δείγματα με λίπος των 1.5 cm χωρίς NaCl, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μεγαλύτερη κατά 1 λογαριθμικό κύκλο συγκριτικά με τα αντίστοιχα άπαχα δείγματα. Επίσης στα δείγματα με λίπος των 3 cm χωρίς NaCl, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μεγαλύτερη κατά 1 λογαριθμικό κύκλο συγκριτικά με τα αντίστοιχα άπαχα δείγματα. Όσον αφορά τους υπόλοιπους παράγοντες, δεν επέδρασαν στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$) στη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου.



Διάγραμμα 3.3.3.1 Η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού μετά την θερμική επεξεργασία στους 71 °C την 20^η μέρα

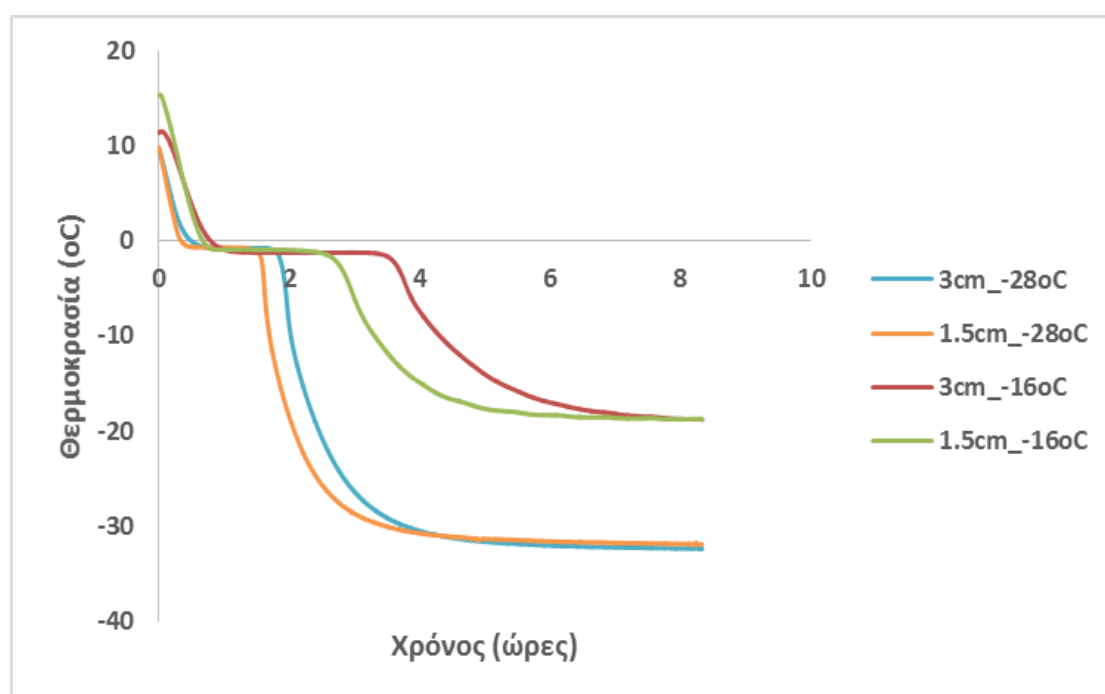


Διάγραμμα 3.3.3.2 Η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού μετά την θερμική επεξεργασία στους 71 °C την 20^η μέρα

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Η ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ & ΤΟΥ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για να διαπιστωθεί η παρακολούθηση του χρόνου και του θερμοκρασιακού προφίλ, σχηματίστηκαν δείγματα των 1.5 cm και των 3 cm και τοποθετήθηκαν στον καταψύκτη με σκοπό να φτάσει η επιθυμητή θερμοκρασία στόχος τους $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ και τους $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η ταχύτητα με την οποία καταψύχθηκαν τα δείγματα φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 4.1.1)



Διάγραμμα 4.1.1 Η επίδραση της κατάψυξης στα δείγματα

Ο ρυθμός με τον οποίο καταψύχονται τα δείγματα (Διάγραμμα 4.1.1) εξαρτάται από την θερμοκρασία κατάψυξης καθώς επίσης και από το μέγεθος του προϊόντος. Αποτελείται από τρεις φάσεις στις οποίες λαμβάνουν χώρα φαινόμενα που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του παθογόνου στα δείγματα.

Η πρώτη φάση αποτελεί το χρόνο που χρειάζονται τα δείγματα από τους $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (θερμοκρασία δωματίου) που βρίσκονται να φτάσουν τους $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στη φάση αυτή

λαμβάνουν χώρα φαινόμενα όπως η βακτηριακή προσαρμογή σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Ακολουθεί η φάση στην οποία η θερμοκρασία είναι κοντά στους 0 °C (φαινόμενο λανθάνουσας θερμότητας). Στη φάση αυτή έχουμε φαινόμενα βακτηριακής προσαρμογής σε χαμηλές θερμοκρασίες αλλά επίσης ξεκινάει ο σχηματισμός παγοκρυστάλλων. Η διαδικασία της κατάψυξης περιλαμβάνει τη μετατροπή του νερού σε πάγο μέσω της δημιουργίας παγοκρυστάλλων και αποτελεί το σημείο κλειδί στο οποίο προσδιορίζεται η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας και η ποιότητα του κατεψυγμένου προϊόντος (Kiani and Sun, 2011). Εκτός όμως από την ποιότητα, η μετατροπή του νερού του βόειου κιμά σε παγοκρυστάλλους έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας νερού του κρέατος σε συνδυασμό με τις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες που επικρατούν, δημιουργείται ένα αντίξοο περιβάλλον για τον μικροοργανισμό που έχει επιμολύνει τα δείγματα. Ο σχηματισμός των παγοκρυστάλλων επηρεάζεται από τον ρυθμό με τον οποίο καταψύχονται τα δείγματα. Όσο πιο ταχύς είναι ο ρυθμός (-28 °C) τόσο πιο μικροί παγοκρύσταλλοι σχηματίζονται και κατ'επέκταση οι μικροί παγοκρύσταλλοι τραυματίζουν λιγότερο τα κύτταρα συγκριτικά με τους μεγάλους παγοκρυστάλλους. Εν αντιθέση, όσο πιο βραδύς είναι ο ρυθμός κατάψυξης (-16 °C) τόσο μεγαλύτεροι παγοκρύσταλλοι σχηματίζονται με αποτέλεσμα να τραυματίζουν περισσότερο τα κύτταρα.

Η τρίτη φάση αποτελεί το χρόνο που χρειάζεται για να φτάσει η θερμοκρασία των δειγμάτων στην θερμοκρασία στόχο καθώς επίσης και σε αυτή την φάση πραγματοποιείται σχηματισμός παγοκρυστάλλων. Όπως παρατηρείται (Διάγραμμα 4.1.1), η διαφορετική θερμοκρασίας κατάψυξης οδήγησε σε διαφορετικό ρυθμό κατάψυξης και διαφορετική διάρκεια φάσης της λανθάνουσας θερμότητας. Παρατηρείται ότι τα δείγματα τόσο των 1.5 cm όσο και των 3 cm που συντηρήθηκαν στους -28 °C, καταψύχθηκαν πιο γρήγορα (περίπου 4 ώρες) συγκριτικά με αυτά που συντηρήθηκαν στους -16 °C. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τα δείγματα που συντηρούνταν στους -28 °C, τα δείγματα των 1.5 cm καταψύχθηκαν πρώτα από εκείνα των 3 cm που συντηρούνταν στους -16 °C. Ακολούθησαν τα δείγματα των 1.5 cm και έπειτα των 3 cm που συντηρούνταν στους -16 °C.

Οι 3 φάσεις που αναλύθηκαν παραπάνω αποτελούν το ρυθμό κατάψυξης ο οποίος εξαρτάται από την θερμοκρασία στόχο της κατάψυξης (ταχύς ή βραδύς ρυθμός). Ο

ρυθμός κατάψυξης επηρεάζει όπως προαναφέρθηκε το σχηματισμό των παγοκρυστάλλων καθώς και το μέγεθος τους που οφείλεται στον ταχύ ή βραδύ ρυθμό κατάψυξης. Κατά συνέπεια επηρεάζεται το επίπεδο τραυματισμού των κυττάρων.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του πειράματος, ο ρυθμός κατάψυξης επηρέασε στατιστικώς σημαντικά ($P < 0.05$) τη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου καθώς παρατηρήθηκε ότι στα δείγματα των 1.5 cm με 30 % λίπος που συντηρήθηκαν στους $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με τα δείγματα των 3 cm με 30 % λίπος που συντηρήθηκαν στους $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$.

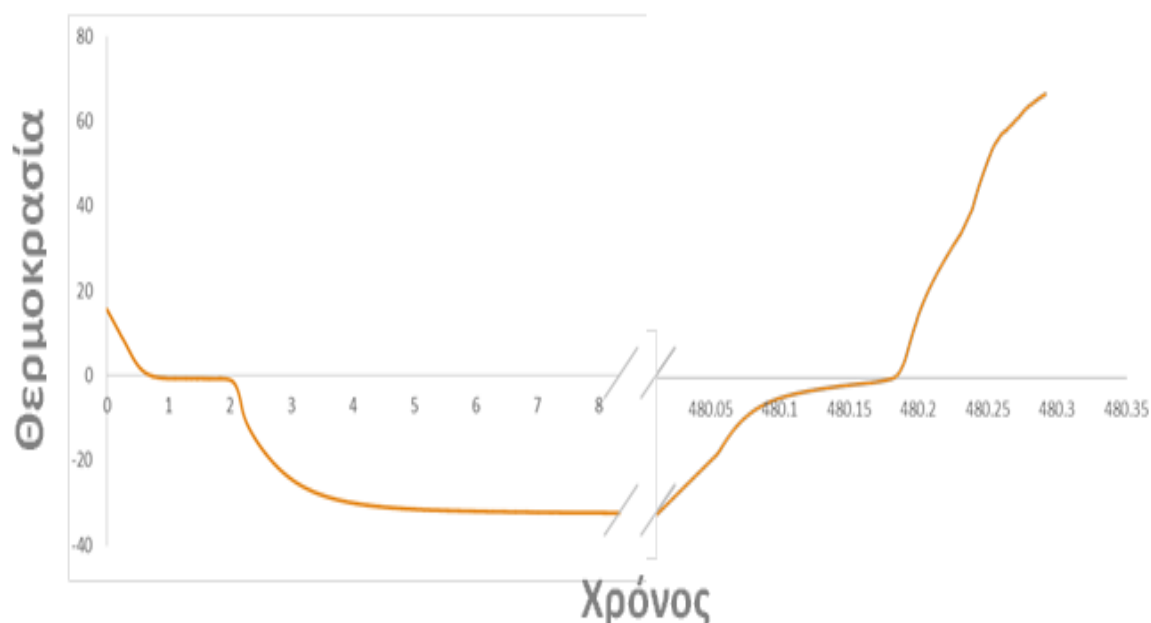
4.2 Η ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ

Προκειμένου να δοθεί μία πιθανή εξήγηση στην αυξημένη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού εξαιτίας της παρατεταμένης διάρκειας κατάψυξης, παρατίθεται διάγραμμα στο οποίο παρουσιάζεται το προφίλ των θερμοκρασιών που ακολουθούν τα δείγματα από όταν είναι ωμά μέχρι τη στιγμή που υπόκεινται σε θερμική επεξεργασία και ποια μπορεί να είναι η επίπτωση των θερμοκρασιών αυτών στην μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου (Διάγραμμα 4.2.1).

Τα δείγματα μετά την προετοιμασία τους και ενώ βρίσκονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος τοποθετούνται στον καταψύκτη και ξεκινάει η πρώτη φάση μέχρι να φτάσει η θερμοκρασία του δείγματος τους $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στη φάση αυτή λαμβάνουν χώρα φαινόμενα όπως η βακτηριακή προσαρμογή σε χαμηλές θερμοκρασίες. Έπειτα ακολουθεί η φάση στην οποία η θερμοκρασία έχει επιτευχθεί κοντά στους $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (φαινόμενο λανθάνουσας θερμότητας). Στο σημείο αυτό το H_2O που υπάρχει στα δείγματα μετατρέπεται σε πάγο. Ο διαφορετικός ρυθμός κατάψυξης οδηγεί σε διαφορετική διάρκεια φάσης της λανθάνουσας θερμότητας καθώς στους $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ τα δείγματα των 3 cm παρέμειναν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα κοντά στους $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ συγκριτικά με τα δείγματα των 1.5 cm που συντηρήθηκαν στους $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Επιπλέον στη φάση αυτή έχουμε φαινόμενα βακτηριακής προσαρμογής σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά επίσης ξεκινάει ο σχηματισμός παγοκρυστάλλων. Όσον αφορά

τα φαινόμενα βακτηριακής προσαρμογής, όταν ο μικροοργανισμός εκτίθεται σε καταπόνηση σε χαμηλές θερμοκρασίες, η κυτταρική ανάπτυξη σταματάει για αρκετές ώρες (φάση εγκλιματισμού) και περιορίζεται η σύνθεση πρωτεϊνών. Υπάρχουν όμως πρωτεΐνες που επάγονται στην ψύξη (cold induced proteins). Μετά τον εγκλιματισμό του μικροοργανισμού η ανάπτυξη και η παραγωγή των πρωτεϊνών συνεχίζει με πιο αργούς ρυθμούς. Επιπλέον όσο εκτίθεται σε καταπόνηση ο μικροοργανισμός (sublethal stresses), πραγματοποιείται η απόκριση του στην καταπόνηση και ενισχύεται η αντοχή του σε μεταγενέστερες καταπονήσεις όπως την θερμική καταπόνηση (cross protection). Όσον αφορά το σχηματισμό των παγοκρυστάλλων, αυτός επηρεάζεται από το ρυθμό με τον οποίο καταψύχονται τα δείγματα. Όσο πιο ταχύς είναι ο ρυθμός (-28 °C) τόσο πιο μικροί είναι οι παγοκρύσταλλοι που σχηματίζονται και κατ'επέκταση οι μικροί παγοκρύσταλλοι τραυματίζουν λιγότερο τα κύτταρα συγκριτικά με τους μεγάλους παγοκρύσταλλους. Επιπλέον η τρίτη φάση αποτελεί το χρόνο που χρειάζεται για να φτάσει το δείγμα στη θερμοκρασία στόχο (θερμοκρασία κατάψυξης) καθώς επίσης και σε αυτή τη φάση πραγματοποιείται ο σχηματισμός παγοκρυστάλλων. Έπειτα από τις 3 πρώτες φάσεις που αποτελούν το ρυθμό κατάψυξης, ακολουθεί ο χρόνος στον οποίο το δείγμα βρίσκεται στην επιθυμητή θερμοκρασία στόχο (θερμοκρασία κατάψυξης). Εδώ πέρα λαμβάνει χώρα η διάρκεια της κατάψυξης, καθώς η παρατεταμένη διάρκεια κατάψυξης συντελεί στη μετέπειτα θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου. Μετά το πέρασμα των ημερών και όταν έρθει η ώρα να πραγματοποιηθεί η θερμική επεξεργασία, τα δείγματα βγαίνουν από τον καταψύκτη και τοποθετούνται στο φούρνο. Στο σημείο αυτό, μέχρι την ώρα που κάνει το δείγμα να φτάσει τους 0 °C, πραγματοποιείται η απόψυξη του. Η διαδικασία της απόψυξης επηρεάζει το επίπεδο τραυματισμού των κυττάρων. Όσο πιο αργή είναι η απόψυξη, τόσο μεγαλύτερος είναι ο τραυματισμός των κυττάρων. Τέλος, στο χρόνο που απαιτείται για να φτάσει το δείγμα στην επιθυμητή θερμοκρασία στόχο (θερμοκρασία θερμικής επεξεργασίας) πριν φτάσει σε θανατηφόρες θερμοκρασίες, δηλαδή πριν φτάσει σε εσωτερική θερμοκρασία ψησίματος τους 65 °C ή 71 °C, υπάρχει επίσης πιθανότητα ο μικροοργανισμός να αποκτήσει θερμοανθεκτικότητα λόγω της έκθεσης του σε μη θανατηφόρες θερμοκρασίες για τουλάχιστον 10 με 20 λεπτά καθώς επίσης ενδέχεται να παράγει heat shock proteins ως απόκριση του στη θέρμανση.

Όλα αυτά τα φαινόμενα που αναλύθηκαν σε συνδυασμό μεταξύ τους ή μεμονωμένα, δίνουν μία πιθανή εξήγηση στην αυξημένη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού εξαιτίας της παρατεταμένης διάρκειας κατάψυξης.



Διάγραμμα 4.2.1 Το προφίλ θερμοκρασιών που ακολουθούν τα δείγματα από τη στιγμή που βρίσκονται ωμά μέχρι τη στιγμή που υπέστησαν θερμική επεξεργασία

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η κατάψυξη έχει τη δυνατότητα να σταματήσει τον μικροβιακό πολλαπλασιασμό (Beauchamp *et al.*, 2010) καθώς τα κύτταρα εκτίθενται σε καταπονήσεις οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε αναστρέψιμες ή μη-αναστρέψιμες μηχανικές βλάβες. Η κατάψυξη επέφερε σημαντικό τραυματισμό των κυττάρων και οδήγησε σε σημαντική μείωση της θερμοανθεκτικότητας του παθογόνου.
- Η ικανότητα του λίπους να προστατεύει τον παθογόνο από την θερμική επεξεργασία και να συμβάλλει στην επιβίωση του (Luchansky *et al.*, 2012) λόγω της ευκολότερης διείσδυσης του παθογόνου στις πιο λιπαρές τροφές (Juneja *et al.*, 1997 και Luchansky *et al.*, 2012) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοανθεκτικότητας του παθογόνου μικροοργανισμού ανεξαρτήτως του μεγέθους των δειγμάτων ή της περιεκτικότητας τους σε NaCl.
- Ο ταχύς ρυθμός κατάψυξης σε συνδυασμό με την παρατεταμένη διάρκεια κατάψυξης των δειγμάτων οδήγησε στην ανάκτηση της εγγενούς θερμοανθεκτικότητας του παθογόνου μικροοργανισμού.
- Η συγκέντρωση του NaCl (2.5 %) δεν ήταν αρκετή να προσδώσει αύξηση στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου, παρατηρήθηκε όμως σε ορισμένες περιπτώσεις η ανασταλτική δράση του καθώς συντέλεσε στη μείωση της επιβίωσης του παθογόνου στα δείγματα που περιείχαν NaCl.
- Το μέγεθος των δειγμάτων δεν επηρέασε την θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου. Μεμονωμένα είχε επιδράσει στατιστικώς σημαντικά στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού. Βλέποντας όμως την συνολική του επίδραση, δεν επηρέασε εν τέλει την θερμοανθεκτικότητα.
- Λόγω της ανασταλτικής δράσης της κατάψυξης, υπάρχει μειωμένος κίνδυνος στα κατεψυγμένα μπιφτέκια τα οποία έχουν επιμολυνθεί με *E. coli* O157:H7 συγκριτικά με εκείνα τα οποία συντηρούνται στην ψύξη. Η κατάψυξη βοηθάει στην πρόληψη της διάδοσης των παθογόνων βακτηρίων και της αλλοίωσης,

αλλά δεν είναι αποτελεσματική στην εξάλειψη του *E. coli* O157:H7 όταν αυτό παρευρίσκεται στις πρώτες ύλες και στο προϊόν (Heuvelink *et al.*, 1999).

- Η παρατεταμένη διάρκεια κατάψυξης δύναται να ευνοήσει τη μερική ανάκτηση της θερμοανθεκτικότητας του *E. coli* O157:H7. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με αντίστοιχη έρευνα στην οποία η συντήρηση του βόειου κιμά στην κατάψυξη στους -28 °C είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση του παθογόνου με μία κατά προσέγγιση μείωση ενός λογαριθμικού κύκλου (Ansay *et al.*, 1999), αποδεικνύοντας την ικανότητα του παθογόνου να επιζεί για μεγάλες χρονικές περιόδους σε θερμοκρασίες κατάψυξης με μικρή μείωση των διαθέσιμων κυττάρων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abee, T., and J. A. Wouters. 1999. Microbial stress response in minimal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 50:65–91.
2. Ahmed, N.M. 1994. Thermal resistance and characterization of *Escherichia coli* O157:H7. Ph.D. dissertation, Auburn University, AL.
3. Ahmed, N.M., Conner, D.E., Huffman, D.L., 1995. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. *J. Food Sci.* 60, 606 – 610.
4. American Meat Institute. 2010. Guideline document: product design, production and preparation of certain ground beef products. Available at: <http://www.meatami.com/ht/a/GetDocumentAction/i/63614>. Accessed 19 September 2011
5. Ansay, S. E., Darling, K. A., & Kaspar, C. W. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ground-beef patties during storage at 2, 2, 15 and then degrees C. *Journal of Food Protection*, 62, 1243–1247
6. Associated Press. (2007). Topps Meat to close down after meat recall. MSNBC. Accessed May 18, 2008, from <http://www.msnbc.msn.com/id/21149977/>
7. Audia, J. P., C. C. Webb, and J. W. Foster. 2001. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:97–106.
8. Banwart, G.J. 1981. *Basic Food Microbiology*. AVI Publishing Company, Inc. Westport, CT.
9. Berry, B. W. (1992). Low fat level effects on sensory, shear, cooking, and chemical properties of ground beef patties. *Journal of Food Science*, 57, 537e540.
10. Blackburn, C. deW., Curtis, L. M., Humpheson, L., Billon, C., & McClure, P. J. (1997). Development of thermal inactivation models for *Salmonella*

- enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 31–44.
11. Boletín Oficial del Estado (BOE). (1998, January 13th). Real Decreto 1916/1997, de 19 de diciembre, por el que se establecen las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de carne picada y preparados de carne.
 12. Biesalski, H.K. (2002). Meat and cancer. Meat as a component of a healthy diet. *Eur. J Clin Nutr. Mar*; 56 Suppl 1:S2-1.
 13. Casey, P., & Condon, S. (2002). Sodium chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H45. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 199–206.
 14. Cassin, M. H., Lammerding, A. M., Todd, E. C. D., Ross, W., & McColl, R. S. (1998). Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 21–44.
 15. CDC (2007). Multistate outbreak of *E. coli* O157 infections linked to Topp's Brand ground beef patties. Available online at: <http://www.cdc.gov/ecoli/2007/october/100207>. html (Accessed October 8th 2013)
 16. CDC (2008). Investigation of multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections. Available online at: <http://www.cdc.gov/ecoli/june2008outbreak/> (Accessed October 8th 2013)
 17. CDC (2009). Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with beef from Fairbank Farms. Available online at: <http://www.cdc.gov/ecoli/2009/1124.html> (Accessed October 8th 2013)
 18. CDC (2009). Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with beef from JBS Swift Beef Company. Available online at: <http://www.cdc.gov/ecoli/2009/0701>. html Accessed October 8th 2013

19. CDC (2010). Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with beef from National Steak and Poultry. Available online at: <http://www.cdc.gov/ecoli/2010/0105.html> (Accessed October 8th 2013)
20. CDC (2010). Twomultistate outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections linked to beef from a single slaughter facility — United States, 2008. MMWR, 59(18), 557–560.
21. Cao-Hoang, L., Dumont, F., Marechal, P. A. & Gervais, P. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* in relation to membrane permeabilization due to rapid chilling followed by cold storage. Arch Microbiol 192, 299–305.
22. Carty, S. M., Sreekumar, K. R. & Raetz, C. R. (1999). Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction at 12 uC of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. J Biol Chem 274, 9677–9685.
23. Clayton, D. A., Griffith, C. J., Price, P., & Peters, A. C. (2002). Food handlers' beliefs and selfreported practices. International Journal of Environmental Health Research, 12, 25–39.
24. Clemens JD, Sack DA, Harris JR, Chakraborty J, Neogy PK, Stanton B, Huda N, Khan MU, Kay BA, Khan MR, Ansaruzzaman M, Yunus M, Rao MR, Svennerholm AM, Holmgren J. (1988). Cross-protection by B subunit-whole cell cholera vaccine against diarrhea associated with heat-labile toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli*: results of a large scale trial. J Infect Dis 158:372-377.
25. Code of Federal Regulations. (2012). Title 9-animals and animal products. In Chapter III e Food safety and inspection service, department of agriculture. Part 319- definitions and standards of identity or composition. Food Safety and Inspection Service, USDA.
26. Cole, M. B., Davies, K. W., Munro, G., Holyoak, C. D., & Kilsby, D. C. (1993). A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. Journal of Industrial Microbiology, 12, 232–239.

27. Conner, D.E. and Hall, G.S. 1994. Efficacy of selected media for recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from frozen chicken meat containing sodium chloride, sodium lactate or polyphosphate. *Food Microbiol.* 11: 337-344.
28. D. Elhanafi, B. Leenanon, W. Bang, and M. A. Drake 2003. Impact of Cold and Cold-Acid Stress on Poststress Tolerance and Virulence Factor Expression of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 1, 2004, Pages 19–26. Copyright ©, International Association for Food Protection.
29. Day NP, Scotland SM, Rowe B. (1981). Comparison of an HEp-2 tissue culture test with the Sereny test for detection of enteroinvasiveness in *Shigella* spp. and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 13:596-597
30. 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.
31. Doyle, M. P. and Schoeni, J. L., 1984. Survival and Growth Characteristics of *Escherichia coli* Associated with Hemorrhagic Colitis. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 855-856.
32. D'Sa, E. M., Harrison, M. a, Williams, S. E., & Broccoli, M. H. (2000). Effectiveness of two cooking systems in destroying *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in ground beef patties. *Journal of Food Protection*, 63(7), 894–899.
33. Ebel, E., Schlosser, W., Kause, J., Orloski, K., Roberts, T., Narrod, C., et al. (2004). Draft risk assessment of the public health impact of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Journal of Food Protection*, 67, 1991–1999.
34. Scientific opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. (2013). *EFSA Journal*, 11(4), 3138.
35. Elder, R., Keen, J., Siragusa, G., Barkocy-Gallagher, G., Koohmaraie, M., & Laegreid, W. (2000). Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 2999–3003.

36. Eslava CA, Villaseca J, Morales R, Navarro A, Cravioto A (1993), Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. Abstr. B-105. In: Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington, DC:American Society for Microbiology, p. 44.
37. Ethelberg, S., Smith, B., Torpdahl, M., Lisby, M., Boel, J., Jensen, T., & Molbak, K. (2007). An outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 caused by beef sausage, Denmark 2007. Euro Surveillance, 12(22) (pii = 3208. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3208> Accessed October 8th, 2013).
38. Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S. P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: mechanistic bases and control. Meat Science, 86, 86e94.
39. Food Safety Authority of Ireland. 2010. The prevention of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) infection: a shared responsibility, 2nd ed. Food Safety Authority of Ireland, Dublin.
40. Food Safety and Inspection Service, 2002. Guidance for Beef Grinders and Suppliers of Boneless Beef and Trim Products. Guidance for Minimizing Impact Associated with Food Safety Hazards in Raw Ground Meat and Other FSIS Regulated Products.
41. Food Safety and Inspection Services. (2007a). Multistate Outbreak of *E. coli* O157 infections linked to Topp's brand ground beef patties. <http://www.cdc.gov/ecoli/2007/october/100207.html>
42. Food Safety and Inspection Services. (2007b). Pennsylvania firm recalls ground beef products due to possible *E. coli* O157:H7 contamination. Recall release. http://www.fsis.usda.gov/PDF/Recall_051-2007_Release.pdf

43. Fratamico, P. M., Smith, J. L., & Buchanan, R. L. (2002). *Escherichia coli*. In D. O. Cliver & H. P. Riemann (Eds.), *Foodborne Diseases* (pp. 79–101). San Diego, California: Academic Press.
44. Geraldine Duffy, Enda Cummins, Pa’draig Nally, Stephen O’ Brien, Francis Butler (2006). A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Meat Science* 74 (2006) 76–88.
45. Geraldine Duffy, Catherine M. Burgess, Declan J. Bolton. 2014. A review of factors that affect transmission and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to fork beef chain. *Meat Science* 97 (2014) 375–383
46. Gibson, A.M. and Roberts, T.A. 1986. The effect of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* in a laboratory medium *Int. J. Food Microbiol.* 3: 183-194
47. Goldstein, 1990 Goldstein, J. N., S. Pollitt, and M. Inouye. 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:283–287.
48. Greenland, K., de Jager, C., Heuvelink, A., van der Zwaluw, K., Heck, M., Notermans, D., van Pelt, W., & Friesema, I. (2009). Nationwide outbreak of STEC O157 infection in The Netherlands, December 2008–January 2009: Continuous risk of consuming raw beef products. *Euro Surveillance*, 14(8).
49. Greatorex JS, Thorne GM. (1994). Humoral immune response to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157:H7 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 32: 1172-1178
50. Γεωργάκης Σ.Α., (2005). *Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης*. Εκδόσεις «Σύγχρονη Παιδεία», Θεσσαλονίκη.
51. Hammond, R. M., Brooks, R. G., Schlottmann, J., Johnson, D., & Johnson, R. J. (2005). Assessing the effectiveness of food worker training in Florida: Opportunities and challenges. *Journal of Environmental Health*, 68(3), 19–24,32.

52. Hamn, M. (1991). Meat as a component of a balanced diet. *Fortscher Med.* May 30;109 (16): 337-40.
53. Heuvelink, A. E., Zwartkruis-Nahuis, J. T. M., Beumer, R. R. and de Boer, E., 1999. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in meats obtained from retail outlets in the Netherlands. *Journal of Food Protection*, 62 (10), 1115-1122.
54. Heuvelink, A. E., Roessink, G. L., Bosboom, K., & de Boer, E. (2001). Zero-tolerance for faecal contamination of carcasses as a tool in the control of O157 VTEC infections. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 13–20.
55. Hicks S, Candy DC, Phillips AD. (1996). Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect Immun* 64:4751-4760.
56. Horn, G., Hofweber, R., Kremer, W. & Kalbitzer, H. R. (2007). Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cell Mol Life Sci* 64, 1457–1470.
57. Huang, I.D., Yousef, A.E., Marth, E.H., and Matthews, M.E. 1992. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in chicken gravy. *J. Food. Prot.* 55: 492-496.
58. Hui, Y. H., Cornillon, P., Guerrero-Legarreta, I., Lim Miang, H., Murell, K. D., & Wai-Kit, N. (2004). *Handbook of frozen foods*. Marcel Dekker, Inc.
59. Ingham, S., Wadhwa, R., Chu, C., & DeVita, M. (2006). Survival of *Streptococcus pyogenes* on foods and food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 69(5), 159–1163.
60. Juneja, V.K., Snyder, O.P., Marmer, B.S., 1997. Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. *Int. J. Food Microbiol.* 35, 231 – 237
61. Juneja, V. K., O. P. Snyder, A. C. Williams, and B. S. Marmer. 1997. Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburger. *J. Food Prot.* 60:1163–1166.

62. Juneja, V. K. & Friedman, M., 2008. Carvacrol and Cinnamaldehyde Facilitate Thermal Destruction of *Escherichia Coli* O157:H7 in Raw Beef. *Journal of Food Protection*, Vol. 71, No 8, pages: 1604-1611
63. Kaspar, C., M. E. Doyle, and J. Archer. 2010. White paper on non-O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources. Available at: http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI_Brief_Non_O157STEC_4_10.pdf. Accessed 6 September 2011.
64. Kiani, H., and Sun, D.,W., 2011. Water crystallization and its importance to freezing of foods: A review. URLs: <http://www.ucd.ie/refrig>, <http://www.ucd.ie/sun>
65. Killinger, K.M., Hunt, M.C., Campbell, R., Kropf, D.H., 2000. Factors affecting premature browning during cooking of store-purchased ground beef. *J. Food Sci.* 65, 585e587.
66. King *et al.*, 2005. King, D. A., Lucia, L. M., Castillo, A., Acuff, G. R., Harris, K. B., & Savell, J. W. (2005). Evaluation of peroxyacetic acid as a post-chilling intervention for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on beef carcass surfaces. *Meat Science*, 69, 401–407.
67. King (née Turner), N. J., & Whyte, R. (2006). Does it look cooked? A review of factors 533 that influence cooked meat color. *Journal of Food Science*, 71(4), 31–40.
68. Kubitscek, H. E. (1990). Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *J. Bacteriol.* 172 (1): 94-101
69. Lammerding, A. M., Fazil, A., Paoli, G. Desmarchelier, P. & Vanderlinde, P. (1999). Shiga toxin-producing *E. coli* in ground beef manufactured from Australian beef: Process improvement. *Food Science Australia*, Brisbane Laboratory.
70. Leenanon, B., and M. A. Drake. 2001. Acid stress, starvation, and cold stress affect post stress behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and nonpathogenic *E. coli*. *J. Food Prot.* 64:970–974.

71. Leyer, G. J., L. L. Wang, and E. A. Johnson. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3752–3755.
72. Line, J.E., Fain, A.R., Moran, A.B., Martin, L.M., Lechowich, R.V., Carosella, J.M., and Brown, W.L. 1991. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157: H7: D-value and z-value determination in ground beef. *J. Food. Prot.* 54: 762-766.
73. Lonergan, E. (2005, Spring). Lecture notes: Influence of conversion off muscle to meat on drip loss. Advanced fresh meats course. Ames, Iowa: Iowa State University.
74. Luchansky, J. B., A. C. S. Porto-Fett, B. A. Shoyer, J. E. Call, W. Schlosser, W. Shaw, N. Bauer, and H. Latimer. 2012. Fate of Shiga toxin-producing O157:H7 and non-O157:H7 *Escherichia coli* cells within blade-tenderized beef steaks after cooking on a commercial open-flame gas grill. *J. Food Prot.* 75:62–70.
75. Luchansky, J. B., A. C. S. Porto-Fett, B. A. Shoyer, J. Phillips, V.C.D. R Eblen, L.V Cook, T.B. Mohr, E. Esteban and N. Bauer. 2013. Fate of shiga toxin-producing O157:H7 and non-O157:H7 *Escherichia coli* cells within refrigerated, frozen or frozen then thawed ground beef patties cooked on a commercial open-flame gas or a clamshell electric grill. *J. Food Prot* 12-432
76. M. A. R. Amalaradjou , S. A. Baskaran , R. Ramanathan , A. K. Johny, A. S. Charles , S. R. Valipe, T.Mattson, D. Schreiber , V. K. Juneja, R. Mancini, K.Venkitanarayanan (2010). Enhancing the thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef patties by trans-cinnamaldehyde. *Food Microbiology* 27 841e844
77. MacKenzie, A. (2011). Burger consumption on the rise. *Canadian Meat Business*, 10,6e8
78. Manios, S.G., Skandamis, P.N., 2015. Effect of frozen storage, different thawing methods and cooking processes on the survival of *Salmonella* spp.

and *Escherichia coli* O157:H7 in commercially shaped beef patties. Meat Science. Volume 101, March 2015, Pages 25–32.

79. Marksberry, C.L., Kropf, D.H., Hunt, M.C., Hague, M.A., Warren, K.E., 1993. Ground beef patty cooked color guide. Kansas Agric. Exp. Stat., Manhattan, KS. Available at: <http://www.usu.edu/nfs/foodscience/faculty/pinking.htm> (accessed 26.05.07).
80. McMeekin, T. A., Presser, K., Ratkowsky, D., Ross, T., Salter, M., & Tienungoon, S. (2000). Quantifying the hurdle concept by modeling the bacterial growth/no growth interface. International Journal of Food Microbiology, 55, 93–98.
81. Mead, P. S., Slutsker, V., Dietz, L. F., McCaig, J. S., Bresee, C., Shapiro, P. M., Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5:607–625.
82. Mermelstein, N. H. 1993. Controlling *Escherichia coli* O157:H7 I meat. Food Technol. 47(4): 90-91
83. Moore, C., Sheldon, B. W., & Jaykus, L. (2003). Transfer of *Salmonella* and *Campylobacter* from stainless steel to romaine lettuce. Journal of Food Protection, 66(12), 2231–2236.
84. Mossel, D. A. A. and Netten, P. V., 1984. Harmful effects of selective media on stressed micro-organisms: nature and remedies. Society for Applied Bacteriology Symposium, 12, 329-369.
85. Murano, E.E. and Pierson, M.D. 1992. Effect of heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. J. Food Prot. 55: 171-175.
86. Musarrat, J. and Ahmad, M., 1988. pH induced damage and repair in *E. coli*. Mutation Research, 193, 219-252.
87. Μπλούκας Ιωάννης Γ. (2007). Τεχνολογία κρέατος. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε
88. National Institute of Infectious Diseases, Japan (2012). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in Japan as of April 2012. IASR 33:115–116.

Available online
at http://www.nih.go.jp/niid/en/index.php?option=com_content&view=article&id=2134:tpc387&catid=865:iasr (Accessed December 19th 2013)

89. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia Coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 6:829-831
90. Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia Coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 6:829-831
91. National Cattlemen's Beef Association, 1999. NCBA Survey of America's Meat Temperature IQ. National Cattlemen's Beef Association, Denver, Colorado. Rhee, M.S., Lee, S.Y., Hillers, V.N., McCurdy, S.M., Kang, D.H., 2003. Evaluation of consumer-style cooking methods for reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J. Food Prot.* 66, 1030e1034.
92. Navarro-Garcia, F., Sears, C., Eslava, C., Cravioto, A., Nataro, J.P. (1999). Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67:2184-2192.
93. Nørrung Birgit, Jens Kirk Andersen, and Sava Buncic (2009). Main Concerns of Pathogenic Microorganisms in Meat. In Fidel Toldrà (Ed.), *Safety of Meat and Processed Meat* (pp. 3–29). Spain: Springer
94. Paramithiotis Spiros, P.N. Skandamis, and George-John E. Nychas (2009). Insights into Fresh Meat Spoilage. In Fidel Toldrà (Ed.), *Safety of Meat and Processed Meat* (pp. 55–82). Spain: Springer
95. Petrak, L. 2010. Burger behemoths. Available at: <http://am1.sosland.com/Olive/ODE/MeatPoultry/PrintPagesView.htm>. Accessed 27 August 2011.
96. Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol* 6, 125–136.

97. Phang, H. S., and C. M. Bruhn. 2011. Burger preparation: what consumers say and do in the home. *J. Food Prot.* 74:1708-1716.
98. Polissi, A., De Laurentis, W., Zangrossi, S., Briani, F., Longhi, V., Pesole, G. & Deho` , G. (2003). Changes in *Escherichia coli* transcriptome during acclimatization at low temperature. *Res Microbiol* 154, 573–580.
99. Ray, B., 1986. Impact of bacterial injury and repair in food microbiology: its past, present and future. *Journal of Food Protection*, 49, 651-655.
100. Rhee, M.-S., Lee, S.-Y., Hillers, V. N., McCurdy, S. M., & Kang, D.-H. (2003). Evaluation of consumer-style cooking methods for reduction of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Journal of Food Protection*, 66(6), 1030–1034.
101. Rhoades, J. R., G. Duffy, and K. Koutsoumanis. 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. *Food Microbiol.* 26:357–376.
102. Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Herbert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. G. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681–685.
103. Salaun Laurence, Snyder Lori A.S. and Saunders Nigel J. (2003). Adaptation by Phase Variation in Pathogenic Bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 0065-21, Volume52.
104. Shen Cangliang, Adler M. Jeremy, Geornaras Ifigenia, Belk E. Keith, Smith C. Gary and Sofos N. John (2010). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Nonintact Beefsteaks of Different Thicknesses Cooked by Pan Broiling, Double Pan Broiling, or Roasting by Using Five Types of Cooking Appliances, *Journal of Food Protection*, Vol. 73, No. 3, 2010, Pages 461–469
105. Shen, C., Geornaras, I., Belk, K. E., Smith, 592 G. C., & Sofos, J. N. (2011a). Thermal inactivation of acid, cold, heat, starvation, and desiccation

- stress-adapted *Escherichia coli* O157:H7 in moisture-enhanced non-intact beef. *Journal of Food Protection*, 74(4), 531–538.
106. Simpson Beauchamp, C., Byelashov, O. A., Geornaras, I., Kendall, P. A., Scanga, J. A., 597 Belk, K. E., Smith, G. M., Sofos, J. N. (2010). Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing, thawing and home storage of frankfurters. *Food Microbiology*, 27(1), 144–149.
 107. Soborg, B., Muller, L., Lassen, S. G., Ethelberg, S., & Molbak, K. (2012). VTEC O157 outbreak September–October 2012 EPI-News, 45.
 108. Sun-Young Lee, Dong-Hyun Kang. 2009. Combined effects of heat, acetic acid, and salt for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory media. *Food Control* 20 (2009) 1006–1012
 109. Tauschek M, Gorrell R, Robins-Browne RM, (2002), Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *PNAS* 99: 7066-7071. Doi:10.1073/pnas.092152899.
 110. USDA, 1998b. Measuring Hamburger Cooking and Ordering Behavior. ERS News Release. Economic and Research Service. US Department of Agriculture, Washington D.C.. <http://www.ers.usda.gov/publications/aer804/aer804c.pdf> (accessed 12.12.08).
 111. USDA-FSIS. (2001). Draft risk assessment of the public health impact of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. Available from <<http://www.fsis.usda.gov/>>, last accessed: March 2006.
 112. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. 2005. HACCP plan reassessment for mechanically tenderized beef products. *Fed. Regist.* 70:30331–30334.
 113. USDA-FSIS (2012). Risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC). Available online at: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/92de038d-c30e-4037-85a6->

114. US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service (2013). Developing Countries Dominate World Demand for Agricultural Products. Available online at: <http://www.ers.usda.gov/amber-waves/2013-august/developing-countries-dominate-world-demand-for-agricultural-products.aspx#.VO-ERV282Nr>
115. US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, (2013b). Safe minimum internal temperature chart. Available at: http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get28answers/food-safety-fact-sheets/safe-614_food-handling/safe-minimum-internal615-temperature-chart/ct_index.
116. Uyttendaele, M., Taverniers, I., & Debevere, J. (2001). Effect of stress induced by suboptimal growth factors on survival of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 31–37.
117. Valadez, A. M., C. Debroy, E. Dudley, and C. N. Cutter. 2011. Multiplex PCR detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O157, O103, O91, O113, O145, O111, and O26 experimentally inoculated in beef carcass swabs, beef trim, and ground beef. *J. Food Prot.* 74:228–239.
118. Vorachek-Warren, M. K., Carty, S. M., Lin, S., Cotter, R. J. & Raetz, C. R. (2002). An *Escherichia coli* mutant lacking the cold shockinduced palmitoleoyltransferase of lipid A biosynthesis: absence of unsaturated acyl chains and antibiotic hypersensitivity at 12 uC. *J Biol Chem* 277, 14186–14193.
119. Wang, G., and M. P. Doyle. 1998. Heat shock response enhances acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:31–34.
120. Williams, N. C., and S. C. Ingham. 1998. Thermotolerance of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894, *Escherichia coli* B, and an rpoSde-

□ deficient mutant of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895 following exposure to 1.5% acetic acid. J. Food Prot. 61:1184–1186.