

## ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

### Η επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών σε συνθήκες κατάψυξης τροφίμων, ως παράγοντας κινδύνου για την υγεία

Η κατάψυξη των τροφίμων αποτελεί τον πλέον διαδεδομένο τρόπο συντήρησής τους. Η κατάψυξη αναστέλλει την ανάπτυξη, περιορίζει αλλά δεν καταστρέφει τους μικροοργανισμούς. Το υπολειπόμενο μικροβιακό φορτίο των τροφίμων και του πάγου συνιστά απειλή για τους καταναλωτές. Σε αυτή την απειλή προστίθενται οι μικροβιακές τοξίνες, που δεν αλλοιώνονται με την κατάψυξη. Οι μηχανισμοί με τους οποίους προσδιορίζεται ο βαθμός επιβίωσης των μικροοργανισμών στο ψύχος δεν είναι απόλυτα γνωστοί. Η επιβίωση εξαρτάται από το είδος των μικροβίων, από το ρυθμό κατάψυξης, από τη διαδικασία κατάψυξης και απόψυξης, από το είδος των τροφίμων και από τυχόν πρόσθετα. Τα κλωστηρίδια και οι βακτηριακοί σπόροι είναι πολύ ανθεκτικοί σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης. Τα Gram-θετικά μικρόβια είναι ανθεκτικότερα των Gram-αρνητικών. Οι ιοί και οι μύκητες είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί. Ορισμένα παθογόνα, όπως *Listeria*, *Campylobacter*, *Salmonella*, αλλά και ιοί, αποτέλεσαν συχνά αίτιο επιδημικών εκρήξεων. Τα τρόφιμα και το νερό πρέπει να στερούνται παθογόνων μικροοργανισμών πριν από την κατάψυξη. Η διαδικασία κατάψυξης, απόψυξης και περαιτέρω διαχείρισης των τροφίμων πρέπει να σέβεται τους υγειονομικούς κανόνες.

#### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κατάψυξη είναι ένας εξαιρετικός τρόπος διατήρησης των τροφίμων. Τεράστιες ποσότητες τροφίμων ανά τον κόσμο καταψύχονται, καθώς η κατάψυξη διατηρεί τη γεύση, τη σύσταση και τη θρεπτική αξία των τροφίμων καλύτερα από κάθε άλλη μέθοδο. Η παγκόσμια απελευθέρωση της διακίνησης των τροφίμων και ο συνεχώς αυξανόμενος χρόνος μεταξύ προετοιμασίας και κατανάλωσης οδηγούν στη ραγδαία ανάπτυξη της «βιομηχανίας κατάψυξης», που περιλαμβάνει την παρασκευή, την αποθήκευση και τη μεταφορά των τροφίμων.

Στις χαμηλές θερμοκρασίες (υπό το μηδέν) οι ρυθμοί των αντιδράσεων μειώνονται δραματικά, έτσι οι μικροοργανισμοί μπορούν να αδρανοποιηθούν στα τρόφιμα σε συνθήκες κατάψυξης για μεγάλες χρονικές περιόδους, καθιστώντας τα ασφαλή για την υγεία του καταναλωτή. Ωστόσο, κάποιοι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να προσαρμόζονται σε δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα μικρόβια, ανάλογα με τη θερμοκρασία όπου αναπτύσσονται, διακρίνονται σε θερμόφιλα, μεσόφιλα και ψυχρόφιλα. Ορισμένα από τα

ψυχρόφιλα αναπτύσσονται σε συνθήκες υπό το μηδέν. Τα συνήθη παθογόνα για τον άνθρωπο μικρόβια είναι μεσόφιλα και άρα η ψύξη και η κατάψυξη των τροφίμων αναστέλλει την ανάπτυξή τους. Η συμπεριφορά των μεσόφιλων οργανισμών σε συνθήκες κατάψυξης έχει ενδιαφέρον. Αν και μέρος του πληθυσμού παθογόνων μικροοργανισμών πεθαίνει ή αδρανοποιείται κατά τη διαδικασία της κατάψυξης, μια υπολειπόμενη ποσότητα κατορθώνει να επιβιώνει στα κατεψυγμένα τρόφιμα, συνιστώντας απειλή για την υγεία. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την πιθανότητα επιδημιών τροφιμογενών λοιμώξεων που σχετίζονται με κατανάλωση κατεψυγμένων τροφίμων.

Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί πολλές επιδημικές εκρήξεις οφειλόμενες σε κατεψυγμένα τρόφιμα ή πάγο που περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς ή τοξίνες. Το παγωτό αποτελεί συνήθη πηγή τροφιμογενούς επιδημικής έκρηξης. Εφόσον το γάλα με το οποίο έχει παρασκευαστεί το παγωτό έχει παστεριωθεί, δεν υφίσταται κίνδυνος για την υγεία του καταναλωτή. Ωστόσο, είναι δυνατή η διασπορά παθογόνων, μετά από επιμείωση παστεριωμένου γάλατος λόγω χρήσης μισμμέ-

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2007, 24(5):432-439  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2007, 24(5):432-439

Π. Δημητράκη,  
Ε.Γ. Βεληνάκης

Εργαστήριο Πρόληψης, Τμήμα  
Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών,  
Αθήνα

The survival of pathogens in frozen  
food as a health risk

Abstract at the end of the article

#### Λέξεις ευρετηρίου

Δημόσια υγεία  
Κατάψυξη τροφίμων  
Μικροβιακή επιβίωση  
Παθογόνα μικρόβια  
Τροφιμογενείς επιδημίες

Υποβλήθηκε 23.5.2005  
Εγκρίθηκε 7.7.2006

νων περιεκτών ή σκευών.<sup>1</sup> Το παγωτό δεν είναι η μοναδική πηγή διασποράς παθογόνων μικροοργανισμών. Επισημαίνεται η εμφάνιση κρουσμάτων χολέρας από κατεψυγμένο γάλα καρύδας στις ΗΠΑ.<sup>2</sup> Επίσης, έχει καταγραφεί επιδημική έκρηξη τυφοειδούς πυρετού από κατανάλωση μισμασμένων κατεψυγμένων φρούτων.<sup>3</sup> Παρασκευάσματα μισμασμένου με *Escherichia coli* κρέατος αποτέλεσαν αιτία επιδημίας στις ΗΠΑ.<sup>4</sup> Κατεψυγμένες φρούδες αποτέλεσαν μέσο διασποράς ηπατίτιδας Α.<sup>5</sup> Τα κατεψυγμένα κρέατα και τα γαλακτοκομικά θεωρείται ότι έχουν προκαλέσει >300 κρούσματα λιστερίωσης τα τελευταία 20 έτη στις ΗΠΑ, δημιουργώντας έντονη ανησυχία στους καταναλωτές.<sup>6</sup>

Η ανασκόπηση των δεδομένων σχετικά με την επιβίωση των μικροοργανισμών είναι χρήσιμη, προκειμένου να κατανοηθούν οι παράγοντες που την επηρεάζουν και να υιοθετηθούν πρακτικές ασφαλείς για την υγεία του καταναλωτή, που θα διατηρούν αναλλοίωτη τη σύσταση και τα χαρακτηριστικά του τροφίμου.

## 2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΨΥΧΟΥΣ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η κατάψυξη μπορεί να προκαλέσει βλάβη των μικροβίων είναι πολλοί. Αυτοί σχετίζονται με τη συγκέντρωση πάγου ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια, με τη συγκέντρωση ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια διαλυτών ουσιών –που σε μεγάλες δόσεις μπορεί να είναι τοξικές για το κύτταρο– με τη μείωση του κυτταρικού όγκου, με οξειδωτική βλάβη.<sup>7-9</sup>

Η συγκέντρωση πάγου εξωκυττάρια οδηγεί σε μετακίνηση όγκου νερού από τον ενδοκυττάριο χώρο, με αποτέλεσμα ρίκνωση του κυττάρου και αυξημένη συγκέντρωση ουσιών εντός αυτού. Κατά την κατάψυξη, η κυτταρική μεμβράνη υφίσταται πρωτογενώς βλάβη, λόγω αποδόμησης της λιπιδιακής δομής της, και δευτερογενώς με την επίδραση των μικροκρυστάλλων, που σχηματίζονται ενδοκυττάρια.<sup>10</sup>

Κατά τη διαδικασία της κατάψυξης, το υδάτινο διάλυμα παραμένει σε υγρή μορφή έως ότου φθάσει τη θερμοκρασία πήξης του, σε κάποια θερμοκρασία υπό το μηδέν. Η πήξη επεκτείνεται σταδιακά σε όλη τη μάζα του τροφίμου. Όταν η τροφή παγώνει, ο πάγος διαχωρίζεται από το υδάτινο διάλυμα και η πίεση ατμών του πάγου είναι σε ισορροπία με την πίεση ατμών του διαλύματος που δεν έχει παγώσει. Καθώς ο πάγος διαχωρίζεται, διαλυτές ουσίες που υπάρχουν στην τροφή συγκεντρώνονται στο εναπομένον υγρό. Οι ουσίες αυτές είναι σάκχαρα, αμινοξέα, αμίνες, άλατα κ.ά. Η συγκέν-

τρωση ουσιών συνεχίζεται αυξανόμενη μέχρι την πήξη του εναπομένου υγρού. Το φυσικοχημικό αυτό περιβάλλον επηρεάζει την επιβίωση των μικροβίων.<sup>11</sup> Τα μικρόβια που έχουν επιβιώσει σε συνθήκες κατάψυξης διατηρούν την ικανότητα ανάπτυξης, όταν βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και θρεπτικού υλικού. Υπάρχουν περιπτώσεις που τα μικρόβια μετά από κατάψυξη δεν είναι δυνατόν να καλλιεργηθούν. Αυτό συμβαίνει ιδιαίτερα αν το θρεπτικό υλικό στο οποίο καταψύχθηκε ο μικροοργανισμός δεν ήταν ευνοϊκό γι' αυτόν. Τα τρόφιμα αποτελούν συνήθως καλό θρεπτικό υλικό.<sup>12</sup>

Τα ψυχρόφιλα βακτήρια διαθέτουν ειδικές πρωτεΐνες, με τις οποίες ευνοείται η ανάπτυξή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Φαίνεται ότι χάρη στις πρωτεΐνες αυτές μπορούν να αντεπεξέλθουν σε ένα ψυκτικό shock. Πιθανόν, τα παθογόνα μικρόβια, που είναι μεσόφιλα, διαθέτουν ή δημιουργούν τέτοιες πρωτεΐνες. Έχει δειχθεί ότι η *Escherichia coli*, που μπορεί να προσαρμόζεται σε ψυχρό περιβάλλον, αναπτύσσει προστατευτικές πρωτεΐνες. Το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάζεται σήμερα στη μεταβίβαση αντοχής στο ψύχος από ένα μικροβιακό είδος σε άλλο, μέσω μεταβίβασης γενετικού υλικού.<sup>13,14</sup>

## 3. ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΟ ΨΥΧΟΣ

Η επιβίωση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα, που είναι αποθηκευμένα σε συνθήκες κατάψυξης, δεν περιορίζεται πάντοτε ανάλογα με τη μείωση της θερμοκρασίας. Αντίθετα, έχει δειχθεί ότι η *Listeria* επιβιώνει περισσότερο σε  $-198\text{ }^{\circ}\text{C}$  συγκριτικά με  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .<sup>15</sup> Η *Salmonella* επιβιώνει λιγότερο σε συνθήκες κατάψυξης μέχρι  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , παρά σε συνθήκες  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .<sup>16</sup> Η καταστροφή των μικροβίων γίνεται κατά τη διάρκεια της κατάψυξης και συνεχίζεται για μερικές ημέρες μετά από τη σταθεροποίηση της θερμοκρασίας. Ακολούθως, το μικροβιακό φορτίο παραμένει σταθερό.<sup>17</sup> Θεωρείται ότι η αποθήκευση των τροφίμων σε θερμοκρασίες κάτω των  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  σχεδόν αναστέλλει την περαιτέρω καταστροφή όσων μικροβίων έχουν επιβιώσει κατά τη διαδικασία κατάψυξης.

Ο ρυθμός κατάψυξης επηρεάζει επίσης την επιβίωση των μικροοργανισμών. Η ταχεία κατάψυξη συνήθως αντιστοιχεί σε μείωση θερμοκρασίας  $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$  σε μισή ώρα, ενώ η αντίστοιχη βραδεία κατάψυξη διαρκεί αρκετές ώρες. Η ταχεία κατάψυξη ευνοεί την επιβίωση των μικροοργανισμών. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί επειδή με

την ταχεία κατάψυξη η πτώση της αναλογίας μερικής πίεσης των ατμών νερού και πάγου είναι ταχύτερη και η έκθεση του μικροοργανισμού σε αυξημένες συγκεντρώσεις βλαπτικών ουσιών είναι μικρότερη. Επίσης, η ταχύτερη ψύξη οδηγεί σε σχηματισμό μικρότερων κρυστάλλων. Ο ρυθμός καταστροφής μικροβίων είναι μεγαλύτερος στα αρχικά στάδια της κατάψυξης και ακολουθώς μειώνεται. Η *Escherichia coli* επιβιώνει καλύτερα όταν ο ρυθμός κατάψυξης είναι 6 °C/min, συγκριτικά με μεγαλύτερους ή μικρότερους ρυθμούς κατάψυξης.<sup>18</sup>

Κατά την απόψυξη, φαίνεται ότι αυξάνεται η κυτταρική καταστροφή λόγω της ανάπτυξης κρυστάλλων. Η παρατεταμένη απόψυξη πιθανόν ευνοεί τον ανασχηματισμό μικροκρυστάλλων, αλλά δεν είναι σαφές αν ο ρυθμός απόψυξης επηρεάζει την επιβίωση των μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα σχετικών μελετών είναι μάλλον αντιφατικά.<sup>8,15,19</sup> Πάντως, αντίθετα προς ό,τι πιστεύεται από το κοινό, η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των τροφίμων οδηγεί σε μείωση του μικροβιακού φορτίου. Βέβαια, αυτό δεν μπορεί να αποτελέσει συνιστώμενη πρακτική για τη δημόσια υγεία, επειδή κατά την απόψυξη στην επιφάνεια των τροφίμων αναπτύσσονται θερμοκρασίες που ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του μικροβιακού φορτίου. Εξάλλου, έτσι αλλάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου. Είναι κατανοητό ότι η απόψυξη σε ψυγείο περιορίζει αυτόν τον κίνδυνο, χωρίς ωστόσο να αποκλείει την ανάπτυξη ψυχρόφιλων μικροοργανισμών. Η χρήση θερμής πηγής ή μικροκυμάτων επιταχύνει την απόψυξη, μη παρέχοντας επαρκή χρόνο για την ανάπτυξη μικροοργανισμών.<sup>20</sup>

Η επιβίωση των μικροοργανισμών κατά την κατάψυξη εξαρτάται από τη σύνθεση του υποστρώματος. Το pH των τροφίμων επηρεάζει την ικανότητα επιβίωσης.<sup>21</sup> Η προσθήκη NaCl άλλοτε περιορίζει την αντοχή των μικροβίων στην ψύξη<sup>22,23</sup> και άλλοτε την αυξάνει.<sup>24,25</sup> Κάποιες ουσίες έχουν την ιδιότητα να προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούνται από την κατάψυξη, συμβάλλοντας έτσι στην επιβίωση των μικροοργανισμών στην κατάψυξη. Οι ουσίες αυτές ονομάζονται κρυοπροστατευτικές. Πρόκειται για μικρομοριακές ενώσεις, όπως σάκχαρα, αμινοξέα, γλυκερόλη, γλυκόλες, αν και μεγαλομοριακές ενώσεις μπορεί να έχουν κρυοπροστατευτική δράση.<sup>26,27</sup> Το αλάτι, όπως αναφέρθηκε, έχει σε ορισμένες περιπτώσεις κρυοπροστατευτική δράση. Ο μηχανισμός με τον οποίο δρουν οι κρυοπροστατευτικές ουσίες δεν είναι απόλυτα σαφής. Σύμφωνα με κάποιες θεωρίες, δεσμεύουν το νερό πλησίον της κυτταρικής επιφάνειας, προστατεύοντας αυτήν από την ψύξη, ή μειώνουν τον ενδοκυττάριο πάγο ή περιορίζουν το

σχηματισμό βλαπτικών ηλεκτρολυτών. Πρόσφατα, έχει δείχθει ότι ορισμένες ουσίες μπορεί να επηρεάσουν τη συμπεριφορά ενός μικροοργανισμού στο ψύχος, παρεμβαίνοντας στο επίπεδο ενζύμων που ασκούν προστατευτική δράση έναντι της οξειδωτικής βλάβης του κυττάρου.<sup>28</sup>

Η επιβίωση των μικροοργανισμών σε κατεψυγμένο κρέας διαφέρει ανάλογα με το είδος του κρέατος και την περιεκτικότητα σε λίπος. Συγκεκριμένα, αυξάνεται όταν η περιεκτικότητα σε λίπος είναι μεγαλύτερη, αλλά όταν η συγκέντρωση λίπους πλησιάζει το 50% η αντοχή των μικροβίων μειώνεται. Αυτό μάλλον οφείλεται στην κρυοπροστατευτική δράση που ασκούν η γλυκερόλη και τα γλυκερίδια, ενώ όταν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αυξηθούν ευνοείται η καταστροφή των μικροβίων από το ψύχος.<sup>29</sup> Η ποσότητα των μικροβίων επηρεάζει το ποσοστό επιβίωσης. Μελέτες με *Vibrio parahaemolyticus* έδειξαν ότι, όταν το μικροβιακό φορτίο υπερβαίνει το 10<sup>7</sup> CFU/mL, ανιχνεύονται μικροοργανισμοί σε αστακούς που έχουν καταψυχθεί σε -24 °C για 18 εβδομάδες, αλλά όχι σε αστακούς όπου το αρχικό μικροβιακό φορτίο ήταν 10<sup>5</sup>. Πιθανόν, τα καταστραφέντα μικρόβια δημιουργούν συνθήκες προστασίας για τα εναπομείναντα. Δεν είναι σαφές αν αυτό οφείλεται στην παραγωγή κρυοπροστατευτικών ουσιών<sup>30</sup> ή στην παραγωγή ειδικών μορίων, όπως λακτόνες ή πρωτεΐνες, που λειτουργούν ως αγγελιοφόροι προς άλλα κύτταρα, ώστε αυτά να προσαρμοστούν στο επικείμενο ψυκτικό stress.<sup>31</sup> Η θερμική επεξεργασία των τροφίμων πριν από την κατάψυξη, η χρήση συντηρητικών και η οξείδωση του pH αποτελούν δραστικές μεθόδους περιορισμού του μικροβιακού φορτίου των τροφίμων.

#### 4. ΕΓΓΕΝΗΣ ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΨΥΞΗ

Η αντοχή των μικροοργανισμών στην ψύξη εξαρτάται από τον τύπο του μικροοργανισμού, το είδος του στελέχους και τη φάση της κυτταρικής ανάπτυξης. Γενικά, επιβιώνουν καλύτερα σε υπό το μηδέν θερμοκρασίες μικρόβια που αναπτύσσονται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, δηλαδή κάτω των 20 °C, συγκριτικά με μικρόβια που πολλαπλασιάζονται σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες.<sup>32</sup> Τα κλωστηρίδια και οι βακτηριακοί σπόροι είναι πολύ ανθεκτικοί σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης, επιβιώνοντας ακόμη και μετά από 20 έτη. Οι Gram-θετικοί κόκκοι είναι ανθεκτικότεροι άλλων μικροβίων και γενικά τα Gram-θετικά μικρόβια είναι ανθεκτικότερα των Gram-αρνητικών στελεχών.<sup>33-35</sup> Παρά το γενικό αυτόν κανόνα, το *Clostridium perfringens* είναι ιδιαίτε-

ρα ευαίσθητο σε διαδικασία κατάψυξης, ενώ τρόφιμα που περιέχουν μεγάλο φορτίο Gram-αρνητικών εντεροπαθογόνων φιλοξενούν μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα κατάψυξης ποσότητα ικανή να απειλήσει την υγεία του καταναλωτή.<sup>35</sup> Οι μύκητες επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στην κατάψυξη ή και πολλαπλασιάζονται, αποτελώντας έτσι πρόβλημα για τη βιομηχανία τροφίμων.<sup>36</sup> Τα πρωτόζωα, οι νηματώδεις σκώληκες και τα περισσότερα παράσιτα είναι ευαίσθητα στη διαδικασία της κατάψυξης. Ωστόσο, οι ωοκύστες του κρυπτοσποριδίου επιβιώνουν ύστερα από κατάψυξη.<sup>33,37</sup> Επίσης, λάμβλιες και αμοιβάδες έχει αναφερθεί ότι έχουν μεταδοθεί στον άνθρωπο μέσω παγωτού ή πάγου.<sup>38</sup>

Οι ιοί παρουσιάζουν εξαιρετική αντοχή στην κατάψυξη. Σχετικές μελέτες αφορούν σε ιούς Coxsackie και πολιομυελίτιδας, ενώ ο πάγος αποτέλεσε μέσο διασποράς νοροϊού, που προκάλεσε γαστρεντερίτιδα.<sup>39-41</sup>

Οι μικροβιακές τοξίνες παραμένουν αναλλοίωτες σε συνθήκες κατάψυξης. Έτσι, είναι δυνατόν να απειλήσουν την υγεία τρόφιμα που περιέχουν πριν από την κατάψυξή τους σταφυλοκοκκική ή αλλαντική τοξίνη.<sup>34</sup> Επίσης, είναι δυνατόν κατεψυγμένα αλιεύματα να φιλοξενούν ιστιδίνη και ισταμίνη, που σχηματίζονται πριν από την κατάψυξη από μικρόβια που προκαλούν αποκαρβοξυλίωση.<sup>42</sup>

Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που βρίσκονται στη φάση εκθετικής ανάπτυξης είναι περισσότερο ευαίσθητοι συγκριτικά με τους πληθυσμούς σε φάση στασιμότητας.<sup>42,43</sup> Έχει δειχθεί ότι η περιεκτικότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε ακόρεστα λιπαρά οξέα αυξάνει την αντοχή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Τα μικρόβια που εμφανίζουν χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης και αναπτύσσονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, δηλαδή αυτά που εμφανίζουν και τη μεγαλύτερη αντοχή σε συνθήκες κατάψυξης, περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα ακόρεστων λιπαρών οξέων.<sup>11,32</sup>

## 5. ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΣΤΟ ΨΥΧΟΣ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΕΙΔΙΚΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

### 5.1. *Campylobacter*

Το *Campylobacter* αποτελεί σημαντική αιτία οξείας βακτηριακής γαστρεντερίτιδας. Τα πουλερικά είναι το κύριο όχημα μετάδοσης του μικροβίου στους ανθρώπους. Η θερμοκρασία της κατάψυξης επηρεάζει σημαντικά το ρυθμό καταστροφής του *Campylobacter* στα πουλερικά, ο οποίος μειώνεται κατά κανόνα όταν μειώνεται η θερμοκρασία. Ενδεικτικά, η ταχεία ψύξη τεμα-

χίων κοτόπουλου από 20–330 sec, προκάλεσε μειώσεις του *Campylobacter* της τάξης του 0,5 log 10 CFU/g, 0,8 log 10 CFU/g, 0,6 log 10 CFU/g και 2,4 log 10 CFU/g στις θερμοκρασίες -80 °C, -120 °C, -160 °C και -196 °C, αντίστοιχα. Σε συνθήκες βραδείας ψύξης για 52 εβδομάδες, η μείωση βρέθηκε 4 log 10 CFU/g και 0,5 log 10 CFU/g σε θερμοκρασίες -20 °C και -86 °C, αντίστοιχα.<sup>44</sup>

Τα επίπεδα του μικροβιακού φορτίου του *Campylobacter* μειώνονται όσο αυξάνει ο χρόνος της αποθήκευσης των πουλερικών κατά την κατάψυξη, αλλά η βιωσιμότητά του διατηρείται στις συνθήκες κατάψυξης που εφαρμόζονται στο εμπόριο. Η πλειονότητα των μελετών αναφέρουν μια σημαντική μείωση των παθογόνων μικροοργανισμών μεταξύ 1 και 3 log μονάδων μέσα στην πρώτη εβδομάδα της αποθήκευσης σε συνθήκες κατάψυξης.<sup>45</sup>

Η διατήρηση των πουλερικών στο ψυγείο πριν από την κατάψυξη μειώνει το ρυθμό καταστροφής των κυττάρων και μάλιστα τόσο περισσότερο, όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος της αποθήκευσης.<sup>46</sup>

### 5.2. *Salmonella*

Τα διάφορα είδη *Salmonella* αποτελούν συχνό αίτιο τροφιμογενούς επιδημίας. Το μικρόβιο αυτό επιβιώνει μερικά σε συνθήκες κατάψυξης. Συγκεκριμένα, κατά τη διαδικασία ψύξης υπάρχει σημαντική μείωση του μικροβιακού πληθυσμού μεταξύ 0 και -10 °C και μικρότερη ακολούθως μέχρι τους -20 °C. Η επιβίωση κατά την αποθήκευση στο ψυγείο είναι μακροχρόνια. Αναφέρεται επιβίωση στο βούτυρο στους -23 °C για 10 εβδομάδες και σε φράουλες για ένα μήνα.<sup>47,48</sup> Η ευαισθησία στην κατάψυξη εξαρτάται από τον ορότυπο της *Salmonella*. Αν και ο εναπομένον αριθμός μικροβίων είναι ικανός να απειλήσει τον καταναλωτή, απαιτείται ένας λανθάνων χρόνος, μέχρις ότου τα επιζήσαντα μικρόβια αναπτυχθούν σε εργαστηριακές καλλιέργειες. Αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε μικροβιολογικό έλεγχο κατεψυγμένων τροφίμων.<sup>49</sup>

### 5.3. *Listeria*

Πρόκειται για παθογόνο μικροοργανισμό που αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες και έτσι δείχνει εξαιρετική ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες κατάψυξης. Επιβιώνει για αρκετές εβδομάδες στους -18 °C σε ποικίλα είδη τροφίμων. Παρατηρήθηκε ελάχιστη μείωση κατά την αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης (-18 °C έως -198 °C) για ένα μήνα.<sup>15</sup> Η επιβίωσή της ελάχιστα

επηρεάζεται από το είδος του τροφίμου. Επιβιώνει σε κρέας, ψάρια, γαλακτοκομικά και σε χυμό αβοκάντο.<sup>50</sup>

#### 5.4. Άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί

Η αντοχή σε συνθήκες κατάψυξης άλλων παθογόνων μικροοργανισμών περιγράφεται στον πίνακα 1.

### 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΩΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΩΝ ΚΑΙ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Η κατάψυξη των τροφίμων αναστέλλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, περιορίζει αλλά δεν καταστρέφει αυτούς. Πολύ περισσότερο, δεν καταστρέφει τις τοξίνες. Η επαναφορά των τροφίμων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ευνοεί την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, που επιβίωσαν στην κατάψυξη. Η μεταφορά κατεψυγμένων τροφίμων από χώρες όπου ενδημούν σπάνιες τροφιμογενείς λοιμώξεις μπορεί να οδηγήσει στην επανεμφάνισή τους σε χώρες όπου πριν από πολλά χρόνια έχουν εξαλειφθεί. Τα κατεψυγμένα τρόφιμα μπορεί να είναι ασφαλή από πλευράς μικροβιακού φορτίου, με τις ακόλουθες υγειονομικές προϋποθέσεις:

- Καλή ποιότητα τροφίμων που πρόκειται να καταψυχθούν. Τα τρόφιμα αυτά πρέπει να έχουν παραχθεί, ακολουθώντας τις υγειονομικές προδιαγραφές. Ειδικότερα, τα αλιεύματα και κυρίως τα οστρακοειδή να προέρχονται από ελεγχόμενους χώρους, τα κρέατα

να παράγονται σε νόμιμα σφαγεία, το γάλα να παστεριώνεται, τα λαχανικά να έχουν υποστεί επαρκή καθαρισμό, το νερό να είναι πόσιμο. Τα τρόφιμα πρέπει να ψύχονται αμέσως μετά από την παραγωγή και αφού υποστούν τον προβλεπόμενο καθαρισμό. Ο έλεγχος των τροφίμων, που περιλαμβάνει και μικροβιολογική ανάλυση, είναι απαραίτητος πριν από την κατάψυξη, ακολουθώντας συγκεκριμένο πρωτόκολλο δειγματοληψίας.

- Τα τρόφιμα πρέπει να καταψύχονται σε κατάλληλη συσκευασία ελεύθερη μικροβίων, που θα αποτρέπει οποιαδήποτε επιμίανση από άλλα τρόφιμα ή αντικείμενα. Η χρήση προσθέτων που διαφοροποιούν το pH ή επιδιώκουν να συμβάλλουν με άλλον τρόπο στη μείωση της επιβίωσης των μικροβίων σε συνθήκες κατάψυξης θα πρέπει να περιορίζεται μόνον όταν είναι απόλυτα τεκμηριωμένη η δράση τους, διαφορετικά μπορεί να επιφέρουν το αντίθετο αποτέλεσμα.
- Η διαδικασία κατάψυξης πρέπει να αποτρέπει επιμόλυνση των τροφίμων από άλλα τρόφιμα και κυρίως από ψυχρόφιλα μικρόβια. Η ταχεία κατάψυξη, που αποτελεί προσηφιλή μέθοδο για τη διατήρηση της υφής και της οργανοληπτικής πληρότητας των τροφίμων, δεν αποτελεί καλύτερη μέθοδο μείωσης των μικροοργανισμών, συγκριτικά με τη βραδεία κατάψυξη. Τα μαγειρευμένα τρόφιμα πρέπει να καταψύχονται με τη μέθοδο της ταχείας κατάψυξης από θερμοκρασία >50 °C, δηλαδή πριν από την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

**Πίνακας 1.** Αντοχή διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών σε συνθήκες κατάψυξης.

<i>Bacillus cereus</i>	Μικροβιακή αντοχή σε κατάψυξη. Κάποια στελέχη είναι ψυχοτρόπα
<i>Escherichia coli</i>	Σταθερός πληθυσμός μικροβίων στο βοδινό κρέας για >9 μήνες στους -20 °C <sup>52</sup>
<i>Shigella</i>	Στους -20 °C ανιχνεύθηκε στο βούτυρο και τη μαργαρίνη μετά από 100 ημέρες και στα αυγά, το γάλα, τα θαλασσινά μετά από 50 ημέρες <sup>53</sup>
<i>Vibrio cholerae</i>	Το μικρόβιο παρέμεινε ενεργό στους -20 °C, <sup>54</sup> ενώ δεν επιβίωσε σε θαλασσινά <sup>55</sup>
<i>Brucella</i>	Επιβιώνει στο κατεψυγμένο γάλα 800 μέρες στους -40 °C. <sup>56</sup> Στο γιαούρτι σε -1 °C το μικρόβιο επιβίωσε 74 ημέρες <sup>57</sup>
<i>Clostridium perfringens</i>	Τα σπόρια του μικροβίου είναι ανθεκτικά, ενώ η βλαστική μορφή των κυττάρων του είναι πολύ ευαίσθητη. Μόνο το 6% επιβίωσε σε κρέας στους -23 °C για 14 μέρες <sup>58</sup>
<i>Clostridium botulinum</i>	Τα σπόρια του μικροβίου είναι ανθεκτικά στην κατάψυξη. Οι τοξίνες του είναι επίσης ανθεκτικές στην κατάψυξη
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Ο στρεπτόκοκκος επιβιώνει σε τρόφιμα στους -20 °C. Στο γάλα, ο πληθυσμός του αυξήθηκε κατά 2,5 φορές σε 23 ημέρες <sup>59</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Πολύ ανθεκτικός στην ψύξη και την απόψυξη. Επιβιώνει στα αποθηκευμένα τρόφιμα σε θερμοκρασία <-20 °C. Στο γάλα, ο πληθυσμός του αυξήθηκε κατά 1,5 φορά σε 23 ημέρες. <sup>59</sup> Οι τοξίνες του είναι πολύ ανθεκτικές σε συνθήκες κατάψυξης
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Ο μικροοργανισμός είναι μετρίως ευαίσθητος στην κατάψυξη και μπορεί να επιβιώσει στα κατεψυγμένα θαλασσινά για μεγάλες περιόδους
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Επιβιώνει σε συνθήκες κατάψυξης. Επιβίωση του μικροβίου στους -17 °C για 6 μήνες σε μοσχαρίσιο κρέας <sup>60</sup>
<i>Trichinella spp</i>	Ορισμένα είδη επιβιώνουν σε -32 °C για 48 ώρες. Ψύξη σε -20 °C για 10-20 ημέρες θεωρείται ασφαλής για εξόντωση του παρασίτου

- Η απόψυξη πρέπει να γίνεται σε συνθήκες που αποτρέπουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών στο εξωτερικό αποψυχθέν μέρος του τροφίμου. Έτσι, συνιστάται αποψυκτικός θάλαμος ή χρήση μικροκυμάτων.
- Τα αποψυχθέντα τρόφιμα πρέπει να υφίστανται δειγματοληπτικούς μικροβιολογικούς ελέγχους. Να λαμβάνεται υπόψη ότι η παρατεταμένη κατάψυξη είναι δυνατόν να καθυστερήσει ή να περιορίσει την ανάπτυξη αποικιών στην καλλιέργεια, αλλά αυτό δεν υποδηλώνει ασφάλεια του τροφίμου.
- Δεν θα πρέπει να υπάρχει διάκριση ως προς την πιθανότητα ύπαρξης παθογόνου μικροβιακού φορτίου μεταξύ κατεψυγμένων και νωπών τροφίμων. Η διαχείριση όλων, δηλαδή καλή προετοιμασία, ψήσιμο σε υψηλή θερμοκρασία και γενικά τήρηση των κανόνων υγιεινής παρασκευής των τροφίμων, πρέπει να τηρείται στο υψηλότερο δυνατό επίπεδο.

## ABSTRACT

### The survival of pathogens in frozen food as a health risk

P.DIMITRAKI, E.VELONAKIS

Laboratory of Prevention, Faculty of Nursing, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2007, 24(5):432–439

Freezing is the prevailing method of preserving high quality in food. Freezing of food inhibits the growth of microorganisms; it reduces their numbers but does not destroy them. The pathogens that survive the freezing procedure constitute a threat to the consumers. In addition, the toxins produced by the pathogens are even less affected by freezing. The survival mechanisms of the microorganisms at low temperatures are not well known. Survival depends on the category of the microbe, the range of freezing, the procedures of freezing and thawing, the type of food and the substrate composition. The *Clostridia* and bacterial spores are extremely resistant to freezing and storage at subzero temperatures. Gram-positive bacteria are generally more resistant than Gram-negative bacteria to freezing. Viruses and fungi are also resistant to freezing. Some pathogens such as *Listeria*, *Campylobacter*, *Salmonellae* and viruses may cause epidemic outbreaks. Food and water should be deprived of pathogens before their freezing procedure. Freezing, thawing and processing of food should be conducted according to hygiene standards.

**Key words:** Food freezing, Food born diseases, Pathogens, Public health, Survival of microbes

## Βιβλιογραφία

1. HENNESSY TW, HELBERG CW, SLUTSKER L, WHITE KE, BESSER-WIEK JM, MOEN ME ET AL. A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from ice cream. *N Engl J Med* 1996, 334:1281–1286
2. TAYLOR JL, TUTTLE J, PRAMUKUL T, O'BRIEN K, BARRET TJ, JOLBITADO B ET AL. An outbreak of cholera in Maryland associated with imported commercial frozen fresh coconut milk. *J Infect Dis* 1993, 167:1330–1335
3. KATZ DJ, CRUZ MA, TREPKA MJ, SUAREZ JA, FIORELLA PD, HAMMOND RM. An outbreak of typhoid fever in Florida associated with an imported frozen fruit. *J Infect Dis* 2002, 186:234–239
4. DHHS CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Escherichia coli* Q 157:H7 infections associated with eating a nationally distributed commercial brand of frozen ground beef patties and burgers. *Colorado Morbidity Mortality Weekly Report* 1997, 46:777–778
5. DHHS CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Hepatitis A associated with consumption of frozen strawberries. *Michigan March Morbidity Mortality Weekly Report* 1997, 45:288–289
6. HEATHER P. Fatal bacteria traced to Sara Lee, Chicago. *Sun Times* 8/1/1991:53
7. LUND BM, BAIRD PARKER TC, GOULD GW. *The microbiological safety and quality of food*. Aspen Publ, Gaithersburg, MD, 2000:122–145
8. POTTER NN. Cold preservation and processing. In: Potter NN (ed) *Food science*. AVI Publ, Westport, CT, 1986:201–205
9. STEAD D, PARK SF. Roles Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze thaw-stress. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66:3110–112
10. SOUZOU H, SATO M, KOJIMA T. Changes in chemical structure and function in *Escherichia coli* cell membranes caused by freezing-thawing. II. Membrane lipid state and response of cells to dehydration. *Biochim Biophys Acta* 1989, 978:112–118

11. ERICKSON MC, HUNG Y. *Quality in frozen food*. New York, 1997:174–183
12. CHANG VP, MILLS EW, CUTTER CN. Comparison of recovery methods for freeze-injured *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter coli* in cell suspensions and associated with pork surfaces. *J Food Prot* 2003, 66:798–803
13. HEBRAUD M, POTIER P. Cold shock response and low temperature adaptation in psychotropic bacteria. *J Mol Microbiol Biochem* 1999, 1:211–219
14. INOUE M, PHADTARE S. Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms. Science's STKE (electronic source: signal transduction knowledge environment), 2004
15. EL-KEST SE, MARTH EH. Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: A review. *J Food Prot* 1992, 55:639–648
16. GEORGALA DL, HURST A. The survival of food poisoning bacteria in frozen foods. *J Appl Bacteriol* 1963, 26:346–358
17. MOORHEAD SM, DYKES GA. Survival of *Campylobacter jejuni* on beef trimmings during freezing and frozen storage. *Lett Appl Microbiol* 2002, 34:72–78
18. CALCOTT PH, McLEOD RA. Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: A theoretical and practical study. *Can J Microbiol* 1974, 20:671–681
19. INGRAM M, MACKAY BM. *Inactivation by cold inhibition and inactivation of vegetative microbes*. Academic Press, New York, 1976:111–115
20. SYED ZIAUDDIN K, RAO DN, RAMESH BS, AMLA BL. Effect of freezing, thawing and frozen storage on microbial profiles of buffalo meat. *J Food Sci Technol India* 1993, 30:456–467
21. DEMCHICK PH, PALUMBO SA, SMITH JL. Influence of pH on freeze-thaw lethality in *Staphylococcus aureus*. *J Food Safety* 1982, 4:185–189
22. ABRAM DD, POTTER NN. Survival of *Campylobacter jejuni* at different temperatures in broth, beef, chicken and cod supplemented with sodium chloride. *J Food Prot* 1984, 47:795–800
23. CONNER DE, HALL GS. Efficacy of selected media for recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from frozen chicken meat containing sodium chloride, sodium lactate or polyphosphate. *Food Microbiol* 1994, 11:337–344
24. GOLDEN DA, BEUCHAT LR. Interactive effects of solutes, potassium sorbate and incubation temperature on growth, heat resistance and tolerance to freezing of *Zygosaccharomyces rouxi*. *J Appl Bacteriol* 1992, 73:524–530
25. HUDSON JA. Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 1992, 14:178–180
26. FENNEMA OR, POWERIE WD, MARTH EH. *Freezing injury and cryoprotectants in low temperature preservation of foods and living matter*. Marcel Dekker, New York, 1973:476–503
27. RAY B, SPECK ML. Freeze-injury in bacteria. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1973, 4:161–213
28. STEAD D, PARK SF. Roles of Fe superoxide dismutase and katalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze-thaw stress. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66:110–112
29. SHERIDAN JJ. The effect of freezing on the survival of pathogens in different meat types and the effect of varying lean fat ratios. In: *Hygiene review*. The National Food Centre, Dublin, 1997:1–8
30. MUNTADA-CARRIGA JM, RODRIGUES-JEREZ JJ, LOPEZ-SABATER EL, MORA VENTURA M. Effect of chill and freezing on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenated of oyster meat. *Lett Appl Microbiol* 1995, 2:225–227
31. ROWBURY RJ. Killed cultures of *Escherichia coli* can protect living organisms from acid stress. *Microbiol Comment* 2000, 146:1759–1760
32. JAY JM. Low-temperature food preservation and characteristics of psychotropic microorganisms. In: *Modern food microbiology*. 5th ed. Chapman & Hall, New York, 1996:328–346
33. MAZUR P. Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. In: Meryman HT (ed) *Cryobiology*. Academic Press, New York, 1996:214–317
34. OLSON JC, NOTTINGHAM PM. *Temperature in microbial ecology of food*. (ICMSF) Academic Press, New York, 1980:1–37
35. SHERIDAN JJ. Survival of *Salmonella Kentucky* in frozen minced pork, beef and lamb. *Irish Journal of Food Science and Technology* 1982, 6:177–181
36. BENEKE ES, STEVENSON KE. Classification of food and beverage fungi. In: *Food and beverage mycology*. 2nd ed. AVI Publ, Westport, Conn, 1987:30–50
37. FAYER R, NERAD T. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62:1431–1433
38. DA LALLA F, RINALDI E, SANTORO D, NICOLIN R, TRAMAIN A. Outbreak of *Endamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* infections in travellers returning from the tropics. *Infection* 1992, 20:78–82
39. DIGIROLAMO R, LISTON J, MATCHES JR. Survival of virus in chilled, frozen and processed oysters. *Appl Microbiol Biotechnol* 1970, 20:58–63
40. EYLES MJ. Assessment of cooked prawns as a vehicle for transmission of viral disease. *J Food Prot* 1983, 46:426–428
41. KHAN AS, MOE CL, GLASS RI, MONROE SS, JIANG X, WANG J ET AL. Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii: Comparison and application of molecular method-based assays. *J Clin Microbiol* 1994, 32:318–322
42. BROWN MH. Microbiological aspects of frozen foods. In: Bald WB (ed) *Food freezing: Today and tomorrow*. Springer-Verlag, New York, 1991:15–25
43. HEGARTY CP, WEEKS OB. Sensitivity of *E. coli* to cold shock during the logarithmic growth phase. *J Bacteriol* 1940, 39:475–484
44. ZHAO T, EZEKE GO, DOYLE MP, HUNG YC, HOWELL RS. Reduction of *Campylobacter jejuni* on poultry by low temperature treatment. *J Food Prot* 2003, 66:652–655

45. YOGASUNDRAM K, SHANE SM. The viability of *Campylobacter jejuni* on refrigerated chicken drumsticks. *Vet Res Commun* 1986, 10:479–486
46. BHADURI S, COTTRELL B. Survival of cold-stressed *Campylobacter jejuni* on ground chicken skin during frozen storage. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70:7103–7109
47. SMIS JE, KELLEY DC, FOLTZ VD. Effects of time and temperature on *Salmonellae* in inoculated butter. *J Milk Food Technol* 1970, 32:485
48. KNUDSEN DM, YAMAMOTO SA, HARRIS LJ. Survival of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157:H7 on fresh and frozen strawberries. *J Food Prot* 2001, 64:1483–1488
49. ENKIRI NK, ALFORD JA. Relationship of the frequency of isolation of *Salmonellae* to their resistance to drying and freezing. *Appl Microbiol* 1971, 21:381–382
50. ITURRIAGA MH, ARVIZU-MEDRANO SM, ESCARTIN EF. Behavior of *Listeria monocytogenes* in avocado pulp and processed guacamole. *J Food Prot* 2002, 65:1745–1749
51. ROBERTS TA, BAIRD-PARKER AC, TOMPKIN RB. (ICMSF) International Commission on Microbiological Specification for foods Microorganisms in food 5. Characteristics of microbial pathogens. London: Blacie Academic & Professional 1996, 23, 38, 39, 72, 200, 462
52. DOYLE MP, SCHOENI JL. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol* 1984, 48:855–856
53. TAYLOR BC, NAKAMURA M. Survival of *Shigellae* in food. *J Hygiene (Camp)* 1964, 62:303–311
54. JOHNSTON MD, BROWN MH. An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperature and studies on their sensitivity to heating and freezing. *J Appl Microbiol* 2002, 92:1066–1077
55. REILLY LA, HACKNEY CR. Survival of *Vibrio cholerae* during cold storage in artificially contaminated seafood. *Journal of Food Science* 1985, 50:838–839
56. KUSDAS CD, MORSE EV. The survival of *Brucella abortus*, USDA strain 2308, under controlled conditions in nature. *Cornell Vet* 1954, 44:216–218
57. GHONIEM NA. The survival period of *Brucella* organisms in relation to pH value in Egyptian yoghurt during different storage temperatures. *Milchwiss* 1972, 27:305–306
58. FRUIN JT, BABEL FJ. Changes in the population of *Clostridium perfringens* type A frozen in a meat medium. *J Food Prot* 1977, 40:622–625
59. VILLANUEVA MR, TYLER JW, THURMOND MC. Recovery of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* from fresh and frozen bovine milk. *J Am Vet Med Assoc* 1991, 15:1398–1400
60. KOUNEV Z. Resistance of *Yersinia enterocolitica* in deep frozen milk. *Food Industry Science* 1987, 3:35–38

Corresponding author:

E. Velonakis, Faculty of Nursing, University of Athens, 113 Papdiamantopoulou street, GR-115 27 Athens, Greece  
e-mail: evelonak@nurs.uoa.gr

.....