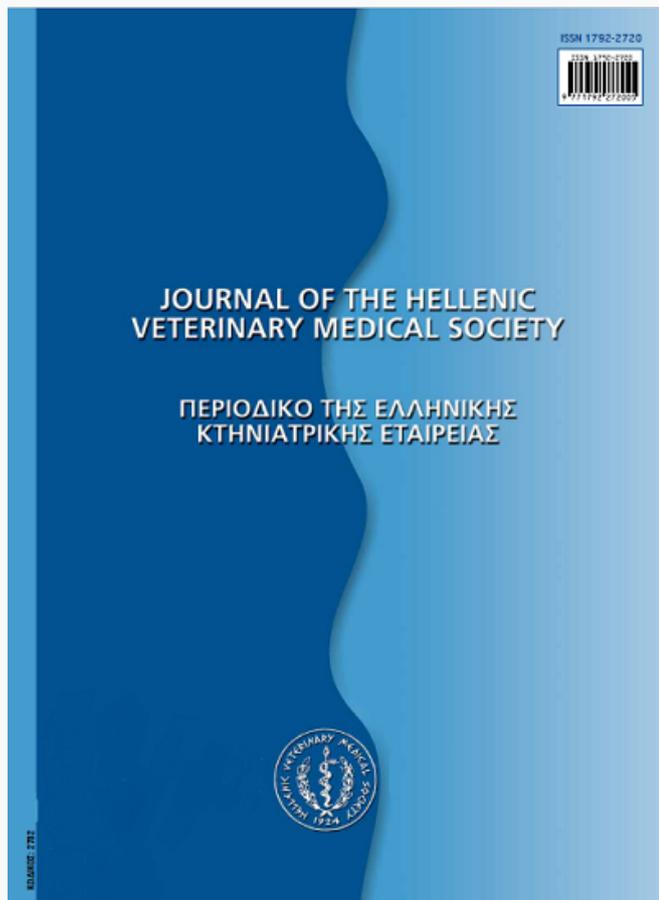


Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 53, No 1 (2002)



Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in Feta cheese during storage

A. GOVARIS (Α. ΓΚΟΒΑΡΗΣ), P. KOIDIS (Π. ΚΟΪΔΗΣ), K. PAPTAEODOROU (Κ. ΠΑΠΑΘΕΟΔΩΡΟΥ)

doi: [10.12681/jhvms.15356](https://doi.org/10.12681/jhvms.15356)

Copyright © 2018, A GOVARIS, P KOIDIS, K PAPTAEODOROU



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

To cite this article:

GOVARIS (Α. ΓΚΟΒΑΡΗΣ) Α., KOIDIS (Π. ΚΟΪΔΗΣ) Ρ., & PAPTAEODOROU (Κ. ΠΑΠΑΘΕΟΔΩΡΟΥ) Κ. (2018). Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in Feta cheese during storage. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 53(1), 24–32. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15356>

Επιβίωση της *Escherichia coli* O157:H7 σε τυρί φέτα κατά τη διάρκεια της συντήρησής της.

Α. Γκόβαρης¹, Π. Κοϊδης², Κ. Παπαθεοδώρου³

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η επιβίωση της *Escherichia coli* O157:H7 σε τυρί φέτα και στην άλμη της μελετήθηκε στη διάρκεια της συντήρησής στους 4°C και 12°C. Η επιμόλυνση του τυριού έγινε με την προσθήκη 5.3 log₁₀ CFU/ml της *E. coli* O157:H7 στην άλμη. Η *E. coli* O157:H7 ήταν ανιχνεύσιμη στην άλμη με ανοφθαλμοσκόπιο στο υπόστρωμα SMAC μέχρι την 40η και 32η μέρα κατά τη συντήρησή της στους 4°C και 12°C αντίστοιχα, ενώ έπειτα από εμπλουτισμό και στη συνέχεια σπορά στο υπόστρωμα SMAC μέχρι την 44η και 36η μέρα στους 4°C και 12°C αντίστοιχα. Η *E. coli* O157:H7 στη φέτα ήταν ανιχνεύσιμη στο υπόστρωμα SMAC μέχρι την 44η και 38η μέρα κατά τη συντήρησή της στους 4°C και 12°C, ενώ έπειτα από εμπλουτισμό και στη συνέχεια σπορά στο υπόστρωμα SMAC μέχρι την 50η και 42η μέρα στους 4°C και 12°C αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *E. coli* O157:H7 επέζησε για μεγαλύτερο διάστημα στη φέτα από ό,τι στην άλμη και για τις δύο θερμοκρασίες συντήρησής αν και η διαφορά αυτή ήταν μικρή. Η επιβίωση της *E. coli* O157:H7 τόσο στη φέτα όσο και στην άλμη ήταν μεγαλύτερη στους 4°C παρά στους 12°C.

Λέξεις ευρετηρίασης: Φέτα, άλμη, *E. coli* O157:H7, συντήρηση

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Escherichia coli* O157:H7 είναι ένα παθογόνο βακτήριο που μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στην υγεία του ανθρώπου και να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατο. Ο παθογόνος αυτός μικροοργανισμός προκαλεί αιμορραγική διάρροια και δημιουργεί επιπλοκές, όπως αιμολυτικό σύνδρομο κυρίως στα νεαρά άτομα και θρομβωτική αιμορραγική πορφύρα κυρίως στα ενήλικα άτομα^{1,2}. Το αιμολυτικό σύνδρομο μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια, η οποία εκτιμάται ότι απολήγει σε θάνατο σε ποσοστό 5-8% των ασθενών³.

Η *E. coli* O157:H7 αναγνωρίστηκε ως ένα σημαντικό

Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Feta cheese during storage.

Govaris A.¹, Koidis P.², Papatheodorou K.³

ABSTRACT. The survival of *E. coli* O157:H7 in Feta cheese and the brine used after 2 months ripening of cheese, was studied during storage at 4°C and 12°C. An inoculum of 5.3 log₁₀ CFU/ml of *E. coli* O157:H7 was added in brine, for the contamination with the pathogen of Feta cheese. *E. coli* O157:H7 was detectable in brine by direct plating on SMAC up to 40th day and 32th day during its storage at 4°C and 12°C respectively, while by enrichment and following plating on SMAC up to 44th day (4°C) and 36th day (12°C). The *E. coli* O157:H7 was detectable in Feta by direct plating on SMAC up to 44th day (4°C) and 38th day (12°C), while by enrichment and following plating on SMAC up to 50th day (4°C) and 42th day (12°C). The results showed that *E. coli* O157:H7 survived longer in Feta than in its brine, for both storage temperatures but the difference was very low. The survival of *E. coli* O157:H7 in feta and brine was longer during the storage at 4°C than at 12°C.

Key words: Feta, *E. coli* O157:H7, storage

INTRODUCTION

Escherichia coli O157:H7 is a pathogen which can cause serious problems in humans health and lead to death. This pathogenic microorganism causes haemorrhagic colitis with complications, such as hemolytic uremic syndrome mainly to young people and thrombocytopenic purpura mainly to adults^{1,2}. The hemolytic uremic syndrome can lead to renal deficiency that can cause death to 5-8% of patients³.

E. coli O157:H7 was recognized as an important food - borne pathogen in 1982 in U.S.A., during certain cases of food - borne outbreaks that were observed in a chain of fast food restaurants, from the consumption of undercooked

¹ Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα.

² Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τομέας Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, ΑΠΘ.

³ Εργαστήριο Γάλακτος "ΟΛΥΜΠΟΣ", Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών Λάρισας, Λάρισα.

¹ Laboratory of Foods Hygiene of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Karditsa, Greece

² Laboratory of Foods Hygiene of Animal Origin, Department of Foods Hygiene & Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, 540 06 Thessaloniki, Greece.

³ Dairy "OLYMPUS", Agricultural Union of Larisa, Larisa, Greece

τροφογενές παθογόνο βακτήριο το 1982 στις ΗΠΑ, κατά την εκδήλωση κρουσμάτων τροφολοιμώξεων που παρατηρήθηκαν σε μια αλυσίδα εστιατορίων, που διέθεταν μπιφτέκια βόειου κρέατος, τα οποία δεν είχαν ψηθεί επαρκώς⁴. Εκτοτε, σοβαρές τροφολοιμώξεις από αυτό το παθογόνο βακτήριο έχουν αναφερθεί σε διάφορες περιοχές σε παγκόσμια κλίμακα (Αγγλία, Γαλλία, Ιαπωνία κλπ.), ακόμη και με θανατηφόρα αποτελέσματα⁵. Πολλές από αυτές προέρχονται από προϊόντα, όπως βόειο κρέας⁶ και γαλακτοκομικά προϊόντα με βάση το αγελαδινό γάλα⁷, αλλά και από άλλα τρόφιμα όπως μαγιονέζα^{8,9} και χυμός μήλου^{10,11} ή άλλα όξινα τρόφιμα όπως σαλάμι¹² και γιαούρτι¹³. Επειδή οι πρώτες τροφολοιμώξεις από την *E. coli* O157:H7 προέρχονταν από απαστερίωτο αγελαδινό γάλα και κρεατοσκευάσματα από βόειο κρέας, τα βοοειδή θεωρήθηκαν ότι ήταν η κύρια πηγή του μικροοργανισμού. Μελέτες έδειξαν ότι οι γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες και ιδιαίτερα τα νεαρά ζώα ήταν φορείς του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού⁷. Στη συνέχεια άλλες μελέτες έδειξαν ότι και άλλα ζώα, όπως οι χοίροι, τα κοτόπουλα, τα πρόβατα και οι αίγες^{6,14,15} ήταν φορείς αυτού του μικροοργανισμού.

H. E. coli O157:H7 μελετήθηκε σε απαστερίωτο και παστεριωμένο γάλα^{7,16} καθώς και σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως όξινη κρέμα, βουτυρόγαλα και γιαούρτι, καθώς και τυριά cottage και cheddar^{17,18,19}. Οι περισσότερες όμως μελέτες έγιναν σε γαλακτοκομικά προϊόντα από αγελαδινό γάλα.

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό τη μελέτη της επιβίωσης της *E. coli* O157:H7 σε τυρί φέτα και στην άλμη αυτής κατά τη διάρκεια της συντήρησής της.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργειες

Τα στελέχη EDL-932 και EDL-933 της *E. coli* O157:H7 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα, παραχωρήθηκαν από τον καθηγητή Κ. Γενηγιώργη. Το κάθε στέλεχος αναπτύχθηκε χωριστά σε 50 ml ζωμού σόγιας TSB (Trypticase soy broth, Oxoid, Basingstoke, England) στους 37°C για 24 h, με δύο διαδοχικές μεταφορές. Τα κύτταρα του βακτηρίου συγκεντρώθηκαν με φυγοκέντρηση (2.500 g/20 min), πλύθηκαν για μία φορά σε 10 ml από 0.1 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Oxoid) και αραιώθηκαν σε 1.0 x 10⁸ CFU/ml σε PBS. Τα δύο στελέχη ενώθηκαν σε περίπου ίσες συγκεντρώσεις. Ο προσδιορισμός του πληθυσμού των βακτηριακών κυττάρων έγινε με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και ακόλουθη αρίθμηση σε Tryptone Soy Agar (Oxoid). Η καλλιέργεια της *E. coli* O157:H7 που παρασκευάστηκε με τον τρόπο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική μόλυνση της φέτας.

Φέτα και επιμόλυσή της με *E. coli* O157:H7

Χρησιμοποιήθηκε ώριμη φέτα που παρασκευάστηκε από αιγοπρόβειο γάλα (80% πρόβειο και 20% αίγιο γάλα) 2 μήνες από την παρασκευή της. Τα τεμάχια της φέτας ήταν σχήματος ορθογωνίου παραλληλεπίπεδου (7x11x8 cm) και είχαν βάρος 0.65 Kg περίπου. Χρησιμοποιήθηκαν

beef burgers⁴. Since then, serious food -borne outbreaks from this pathogen have been reported in several countries throughout the universe (England, France, Japan etc.) and several deaths⁵ have been also reported. Most of these outbreaks were caused from products, such as beef meat⁶ and dairy products of cows milk origin⁷, as well as from other foods such as mayonnaise^{8,9}, apple cider^{10,11} and other acid foods such as salami¹² and yogurt¹³. Since first food-borne outbreaks were derived from products of cows origin (meat products and raw milk), the cattle were considered to be the main reservoir of the pathogen. Studies showed that dairy cattle and in particular young calves were the carriers of this microorganism⁷. Later on, other studies also showed that other animals like pigs, chicken, sheep and goats^{6,14,15} were carriers of this microorganism.

E. coli O157:H7 was studied in pasteurized and unpasteurized milk^{7,16}, as well as in various dairy products such as sour cream, butter milk and yogurt, cottage and cheddar cheese^{17,18,19}. Most of these works was made for dairy products of cows origin.

The present work is aimed to study the survival of *E. coli* O157:H7 in Feta cheese and its brine during storage.

MATERIALS AND METHODS

Cultures

The cultures of *E. coli* O157:H7 used in the present study were obtained from Professor Genigiorgis (strains EDL-932 and EDL-933). Each strain was grown separately in 50 ml of TSB (Trypticase soy broth, Oxoid, Basingstoke, England) for 24 h at 37°C, with two consecutive transfers. The bacterial cells pelleted by centrifugation at 2,500xg for 20 min, washed once in 10 ml of 0.1 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Oxoid), and diluted to 1,0 x10⁸ CFU/ml in PBS. The two strains were combined at about equal concentrations. Cell counts were determined by serial dilution and subsequent enumeration on Tryptone Soy Agar (Oxoid). The inoculum of *E. coli* O157:H7 was used to contaminate the Feta cheese.

Contamination of Feta cheese with *E. coli* O157:H7

Ripen Feta was used after two months of preparation. Feta cheese was made from ewe's milk (80%) and goat's milk (20%). The cheese blocks were of rectangular shape (7x11x8 cm) with a weight of 0.65 Kg. Three tin containers (23x23x35 cm) were used for each test. Each container had three layers of cheese, and each layer had 6 blocks of cheese. Each container had about 2.5 Kg of salt brine. The inoculum of *E. coli* O157:H7 was mixed with the brine, placed in a sterile container, and then under sterile conditions the brine was equally distributed in Feta containers. After contamination, the population of the pathogen was ca 5.3 log₁₀ CFU/ml in the brine. Then, the cheese was stored at 4°C and 12°C.

Enumeration of *E. coli* O157:H7

At each designated sampling period, samples of cheese

3 μεταλλικά δοχεία για κάθε πείραμα (23 cm x 23 cm x 35 cm), που το καθένα είχε 3 σειρές από 6 κομμάτια της φέτας σε κάθε σειρά. Το κάθε δοχείο περιείχε περίπου 2.5 Kg άλμης. Η επιμόλυνση της φέτας έγινε με προσθήκη της καλλιέργειας της *E. coli* O157:H7 στην άλμη που είχε συγκεντρωθεί σ' ένα κοινό αποστειρωμένο μεταλλικό δοχείο και στη συνέχεια με άσηπτες συνθήκες, έγινε ισόποση κατανομή της στα δοχεία. Ο πληθυσμός του βακτηρίου που προστέθηκε υπολογίστηκε έτσι ώστε η άλμη να περιέχει περίπου $5.3 \log_{10}$ CFU/ml κύτταρα. Επειτα το τυρί συντηγήθηκε σε θερμοκρασίες 4 °C και 12 °C.

Αριθμηση της *E. coli* O157:H7

Σε κάθε προγραμματισμένη δειγματοληψία, τα δείγματα τυριών παίρνονταν άσηπτα, με κάθετη τομή από το μέσο του εξεταζόμενου τεμαχίου της φέτας των 0.65 Kg. Ακολούθως διπλά δείγματα από 50 g τυρί ή 10 ml από την άλμη, μεταφέρονταν σε αποστειρωμένες σακκούλες stomacher και αραιώνονταν 1:10 σε ζωμό tryptose broth με 2% sodium citrate. Η πρώτη αραιώση για τα δείγματα της φέτας γινόταν με αραιωτικό θερμοκρασίας περίπου 40 °C. Μετά την 10^{-1} αραιώση, οι επόμενες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις γίνονταν σε 0.1% phosphate buffer saline (PBS, Oxoid) και ακολούθως γινόταν ενοφθαλμισμός επιφανειακά με 0.2 ml σε Sorbitol-McConkey Agar (SMAC, Oxoid). Στη συνέχεια τα τρυβλία επωάζονταν στους 37 °C για 24-48 h. Όταν η *E. coli* O157:H7 δεν ήταν ανιχνεύσιμη στο υπόστρωμα SMAC, για την αναζήτηση των επιζώντων ή αδρανοποιημένων κυττάρων, εφαρμόζονταν η μέθοδος του εμπλουτισμού^{7,8}. Αυτή η μέθοδος γινόταν με τη χρήση ζωμού (*E. coli*, CM 990, Oxoid) που περιείχε novobiocin (SR 181, Oxoid). Η παρουσία της *E. coli* O157:H7 στον εμπλουτιστικό αυτό ζωμό, επιβεβαιωνόταν με απευθείας επιφανειακό ενοφθαλμισμό (0.1 ml) σε Sorbitol-McConkey Agar (SMAC, Oxoid). Σε περιπτώσεις αμφίβολης αναγνώρισης των χαρακτηριστικών αποικιών, αυτές υποβάλλονταν σε έλεγχο με API τεστ και συγκόλληση με αντιγόνο O:157 (*E. coli* O157 Latex test, Oxoid).

Φυσικοχημική εξέταση

Το λίπος επί ξηρού και η υγρασία της φέτας καθώς και το χλωριούχο νάτριο της φέτας και της άλμης προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τους Bradley και συν.²⁰. Το pH των δειγμάτων φέτας και άλμης προσδιορίστηκε με πεχάμετρο (WTW, type 525, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, GmbH, D 82362 Weilheim, Germany).

Στατιστική ανάλυση

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε διπλά δείγματα και τα πειράματα επαναλήφθηκαν δύο φορές. Οι στατιστικές διαφορές αξιολογήθηκαν με το t-test, μετά από ανάλυση των διακυμάνσεων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επιμόλυνση της φέτας, μετά την έξοδό της από το ωριμαντήριο με *E. coli* O157:H7, θα μπορούσε να γίνει με την προσθήκη άλμης μολυσμένης με τον παθογόνο αυτόν

were taken under sterile conditions, by cutting the cheese block of 0.65 Kg at the middle. Duplicate samples of 50 g and 10 g of brine were transferred to sterile Stomacher bags and diluted in 1:10 in Tryptose broth with 2% of sodium citrate. The initial dilution for the Feta samples were made with a diluent at a temperature of 40 °C. After the 10^{-1} dilution, next serial decimal dilutions were made in 0.1% phosphate buffer saline (PBS, Oxoid) and subsequent striking with 0.2 ml of the dilution on the surface of Sorbitol-McConkey Agar (SMAC, Oxoid). The inoculated plates were incubated at 37 °C for 48 h. When *E. coli* O157:H7 was not detectable on SMAC plates, for the enumeration of injured or stressed cells, the enrichment method was applied^{7,8}. This method uses the *E. coli* broth (*E. coli*, CM 990, Oxoid) supplemented with novobiocin (SR181, Oxoid). The presence of *E. coli* O157:H7 in the enrichment broth, was verified with direct striking of 0.1 ml on Sorbitol-McConkey Agar (SMAC, Oxoid). In cases of non characteristic colonies of *E. coli* O157:H7, confirmation was made using the API test with antiserum of O157 (*E. coli* O157 Latex test, Oxoid).

Physicochemical analysis

The fat in dry matter, water and sodium chloride content of Feta and brine were determined according to Bradley et al.²⁰. The pH of Feta and brine samples was determined with a pH meter (WTW, type 525, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, GmbH, D 82362 Weilheim, Germany).

Statistical analysis

All microbiological assays were performed in duplicate and the entire study was duplicated. Statistical differences were determined using the Students t-test after analysis of variance.

RESULTS AND DISCUSSION

After ripening, Feta could be contaminated with *E. coli* O157:H7 with addition of brine having this pathogen (e.g. unpasteurized brine), during handling of Feta with an infected handler and during contact of Feta with dirty-infected surfaces in plastic containers with or without brine. Before the experimental contamination, *E. coli* O157:H7 was not detected in Feta cheese and brine.

Composition of Feta used in present tests is shown in Table 1 and is in accordance with the Greek State Regulations of Foods and Beverages²¹. The sodium chloride found in brine was 5.5%.

The changes in populations of *E. coli* O157:H7 and pH in Feta cheese and brine during storage at 4 °C, are shown in Figure 1. The initial population of *E. coli* O157:H7 ($5.4 \log_{10}$ CFU/ml) in brine, showed a decrease throughout the storage at 4 °C. The pathogen was detectable on SMAC plates until the 40th day. After enrichment and subsequent striking on SMAC, *E. coli* O157:H7 was detectable until the 44th day. The population of *E. coli* O157:H7, due to movement in inner parts of Feta cheese blocks, increased

Πίνακας 1. Σύσταση της φέτας που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα επιμόλυνσης με *E. coli* O157:H7.**Table 1.** Composition of Feta cheese used in contamination tests with *E. coli* O157:H7.

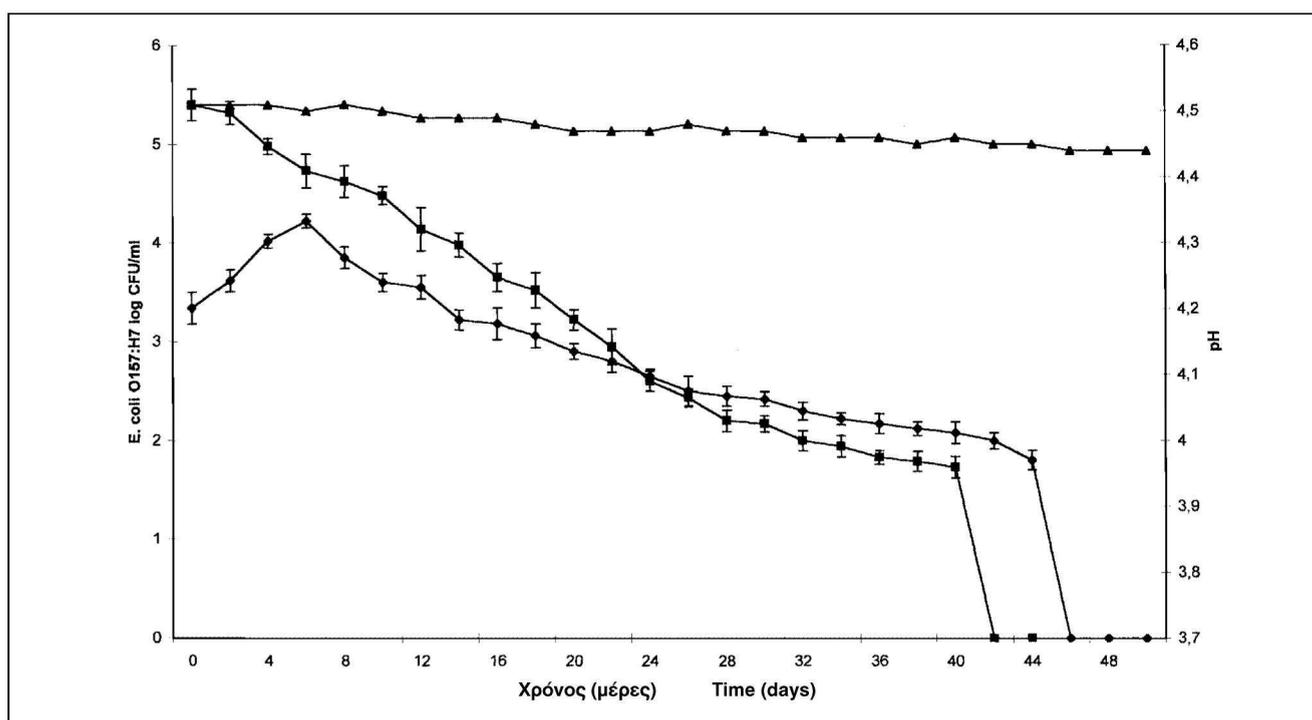
Χρόνος Time	Λίπος επί ξηρού%* Fat in dry matter%*	Υγρασία%* Moisture%*	Χλωριούχο Νάτριο%* Sodium chloride%*
Αρχή συντήρησης Start of storage	43.3 ± 0.4 ^a	53.8 ± 0.4 ^a	2.2 ± 0.11 ^a
Τέλος συντήρησης στους 4 °C End of storage at 4 °C	43.1 ± 0.3 ^a	53.9 ± 0.1 ^a	2.3 ± 0.09 ^a
Τέλος συντήρησης στους 12 °C End of storage at 12 °C	45.4 ± 0.2 ^b	50.1 ± 0.3 ^b	2.5 ± 0.15 ^b

* Μέσος όρος ± τυπική απόκλιση.

* Mean ± standard deviation.

Εκθέτες στην ίδια στήλη με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P<0.05).

Values in the same column with different superscript letters are significantly different (P<0.05).

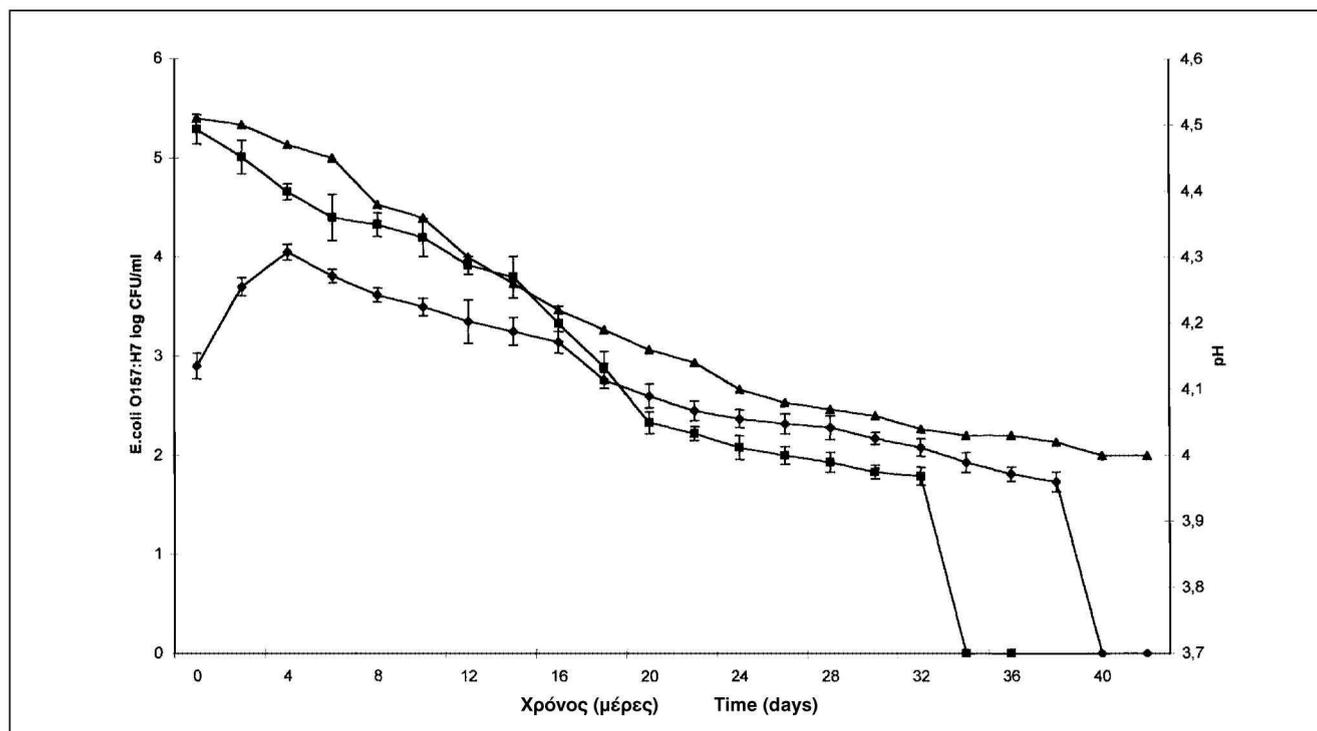
**Εικόνα 1.** Μεταβολές του πληθυσμού της *E. coli* O157:H7 και του pH στη φέτα και στην άλμη της κατά τη διάρκεια της συντήρησής στους 4 °C.*E. coli* O157:H7 στην άλμη (■); *E. coli* O157:H7 στη φέτα (◆); pH (▲).**Figure 1.** Changes in population of *E. coli* O157:H7 and pH in feta cheese and its brine during storage at 4 °C.*E. coli* O157:H7 in brine (■); *E. coli* O157:H7 in feta (◆); pH (▲).

μικροοργανισμό (πχ. απαστερωτή άλμη), κατά το χειρισμό της φέτας από μολυσμένους χειριστές καθώς και κατά την επαφή της φέτας με μολυσμένες επιφάνειες σε πιθανή ανασυσκευασία της σε πλαστικές θήκες με ή χωρίς άλμη. Πριν από την πειραματική επιμόλυνση, η *E. coli* O157:H7 δεν ανιχνεύθηκε στη φέτα και την άλμη της.

Η σύσταση της φέτας που χρησιμοποιήθηκε στους πειραματισμούς σημειώνεται στον Πίνακα 1 και βρίσκεται σε αντιστοιχία με αυτά που ορίζει ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών²¹. Το ποσοστό του NaCl που βρέθηκε στην άλμη ήταν 5.5%.

Οι μεταβολές του πληθυσμού της *E. coli* O157:H7 και του pH στη φέτα και στην άλμη της κατά τη συντήρησή της στους 4 °C, φαίνονται στην Εικόνα 1. Ο αρχικός πληθυσμός

from 3.4 log₁₀CFU/g to 4.22 log₁₀CFU/g on the 6th day, and a decrease was observed later on. *E. coli* O157:H7 was detectable on SMAC plates until the 44th day and after enrichment and subsequent striking on SMAC until the 50th day. The populations of *E. coli* O157:H7 in brine, compared with those in Feta cheese during the same



Εικόνα 2. Μεταβολές του πληθυσμού της *E. coli* O157:H7 και του pH στη φέτα και στην άλμη της κατά τη διάρκεια συντήρησής στους 12 °C.

E. coli O157:H7 στην άλμη (■); *E. coli* O157:H7 στη φέτα (◆); pH (▲).

Figure 2. Changes in population of *E. coli* O157:H7 and pH in feta cheese and its brine during storage at 12 °C.

E. coli O157:H7 in brine (■); *E. coli* O157:H7 in feta (◆); pH (▲).

της *E. coli* O157:H7 (5.4 log₁₀ CFU/ml) στην άλμη, παρουσίασε μείωση σ'όλη τη διάρκεια συντήρησης στους 4 °C. Ο παθογόνος αυτός μικροοργανισμός ήταν ανιχνεύσιμος στο υπόστρωμα SMAC μέχρι την 40η μέρα. Μετά από εμπλουτισμό και ακόλουθο ενοφθαλμισμό σε υπόστρωμα SMAC ήταν ανιχνεύσιμος μέχρι και την 44η μέρα. Ο πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 στη φέτα παρουσίασε διεύθυνση από 3.4 log₁₀ CFU/g σε 4.22 log₁₀ CFU/g την 6η μέρα, ενώ στη συνέχεια παρουσίασε μείωση. Η *E. coli* O157:H7 ήταν ανιχνεύσιμη στο υπόστρωμα SMAC μέχρι την 44η μέρα και μετά από εμπλουτισμό και ακόλουθο ενοφθαλμισμό σε υπόστρωμα SMAC μέχρι και την 50η μέρα. Οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 της άλμης, συγκρινόμενοι με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της *E. coli* O157:H7 στη φέτα στα ίδια χρονικά διαστήματα ελέγχου, βρέθηκαν ότι ήταν σημαντικά μεγαλύτεροι (P<0.05) μέχρι την 20η μέρα, χωρίς σημαντική διαφορά (P>0.05) μεταξύ 22ης μέρας και 26ης μέρας και μετέπειτα σημαντικά μικρότεροι (P<0.05) μέχρι το τέλος των πειραματισμών συντήρησης στους 4 °C. Στο ίδιο χρονικό διάστημα, μεταξύ των μετρήσεων του pH της φέτας και της άλμης, δέν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές (P>0.05). Η πτώση του pH της φέτας και της άλμης στο τέλος του χρόνου συντήρησης στους 4 °C (50η μέρα) ήταν μικρότερη των 0.07 μονάδων.

Οι μεταβολές του πληθυσμού της *E. coli* O157:H7 και του pH στη φέτα και στην άλμη κατά τη συντήρησή τους στους 12 °C απεικονίζονται στην Εικόνα 2. Ο αρχικός πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 (5.29 log₁₀ CFU/ml) στην άλμη παρουσίασε μείωση καθ'όλη τη διάρκεια συντήρησης της φέτας στους 12 °C. Η *E. coli* O157:H7 στην άλμη ήταν ανιχνεύσιμη μέχρι την 32η μέρα στο υπόστρωμα SMAC και

sampling times, were found to be significantly higher (P<0.05) until the 20th day, without significant difference (P<0.05) between the 22nd and the 26th day and afterwards significantly different (P<0.05) until the end of storage at 4 °C. During the same time, there was no significant difference (P>0.05) between measurements in pH of Feta cheese and brine. The decrease in pH of Feta and brine by the end of storage at 4 °C (50th day) was less than 0.07.

The changes in population of *E. coli* O157:H7 and pH in Feta and brine during storage at 12 °C are shown in Figure 2. The initial population of *E. coli* O157:H7 (5.29 log₁₀ CFU/ml) in brine showed a decrease throughout the storage of Feta at 12 °C. *E. coli* O157:H7 in brine was detectable until the 32nd day on SMAC plates and until the 36th day after enrichment and subsequent striking on SMAC plates. The population of *E. coli* O157:H7, due to movement in inner parts of Feta cheese blocks, increased from 2.90 log₁₀ CFU/g on the 1st day to 4.05 log₁₀ CFU/g on the 4th day of storage at 12 °C. Then, the population of *E. coli* O157:H7 showed a decrease until the end of storage at 12 °C. *E. coli* O157:H7 was detectable on SMAC until the 38th day and after enrichment and subsequent striking on

μέχρι την 36η μέρα μετά από εμπλουτισμό και ακόλουθο ενοφθαλμισμό στο υπόστρωμα SMAC. Ο πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 στη φέτα παρουσίασε διείσδυση από 2.90 log₁₀ CFU/g την 1η μέρα σε 4.05 log₁₀ CFU/g την 4η μέρα συντήρησης στους 12° C. Ακολούθως, ο πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 παρουσίασε μείωση μέχρι το τέλος χρόνου συντήρησης στους 12° C. Η *E. coli* O157:H7 ήταν ανιχνεύσιμη στο υπόστρωμα SMAC μέχρι την 38η μέρα και μετά από εμπλουτισμό και ακόλουθο ενοφθαλμισμό στο υπόστρωμα SMAC την 42η μέρα. Οι πληθυσμοί της *E. coli* O157:H7 της άλμης, συγκρινόμενοι με τους αντίστοιχους πληθυσμούς της *E. coli* O157:H7 στη φέτα, στα ίδια χρονικά διαστήματα ελέγχου, βρέθηκαν ότι ήταν σημαντικά μεγαλύτεροι (P<0.05) μέχρι τη 14η μέρα, χωρίς σημαντική διαφορά (P>0.05) μεταξύ 16ης μέρας και 18ης μέρας και μετέπειτα σημαντικά μικρότεροι (P<0.05) μέχρι το τέλος του πειράματος συντήρησης στους 12° C. Το αρχικό pH της φέτας και της άλμης μειώθηκε από 4.51 και έφθασε στο 4.0 με το τέλος συντήρησης στους 12° C (42η μέρα).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *E. coli* O157:H7 μπορεί να επιζήσει στο όξινο περιβάλλον της φέτας και της άλμης και σε pH μικρότερο του 4.5, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η *E. coli* O157:H7 είναι ανθεκτική σε όξινα τρόφιμα όπως ο χυμός μήλου^{10,22}, η μαγιονέζα^{8,9,23,24}, το γιαούρτι¹⁷, τα αλλαντικά αέρος^{12,25} και ότι μπορεί να επιζεί σε αυτά, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι μετά από εμπλουτισμό και ακόλουθο ενοφθαλμισμό στο υπόστρωμα SMAC ο χρόνος επιβίωσης της *E. coli* O157:H7 διήρκεσε 50 μέρες και 44 μέρες για τη φέτα που συντηρήθηκε στους 4° C και 12° C αντίστοιχα, για δε την άλμη 44 και 36 μέρες στους 4° C και στους 12° C αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *E. coli* O157:H7 επέζησε για μεγαλύτερο διάστημα στη φέτα απ'ότι στην άλμη, παρά το γεγονός ότι ο παθογόνος μικροοργανισμός προστέθηκε αρχικά στην άλμη. Αν και η διαφορά του χρόνου επιβίωσης της *E. coli* O157:H7 στη φέτα από την άλμη ήταν μικρή, αποδείχθηκε ότι το τυρί παρουσιάζει καλύτερες συνθήκες επιβίωσης για τον παθογόνο αυτό μικροοργανισμό απ'ότι η άλμη. Το γεγονός αυτό της μεγαλύτερης επιβίωσης της *E. coli* O157:H7 στη φέτα από την άλμη, παρουσιάστηκε μετά την 26η μέρα στους 4° C και μετά τη 18η μέρα στους 12° C. Οι σημαντικά μεγαλύτερες διαφορές (P<0.05) των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 στην άλμη απ'ότι στη φέτα στα αρχικά χρονικά διαστήματα θα μπορούσε να οφείλεται στη διείσδυση του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού από την άλμη στη φέτα.

Το γεγονός της διείσδυσης-εξισορρόπησης των πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 από την άλμη στη φέτα φαίνεται από την αριθμηση των μεγαλύτερων πληθυσμών της *E. coli* O157:H7 στη φέτα την 6η μέρα στους 4° C και την 4η μέρα στους 12° C, ενώ αντίστοιχα στην άλμη εμφάνιζε διαρκή πτώση στο ίδιο χρονικό διάστημα.

Ο Hudson και συν.²⁶ βρήκαν ότι η *E. coli* O157:H7 στο τυρί μειώθηκε κατά 3 log σε σχέση με τους αρχικούς πληθυσμούς που προστέθηκαν στο γάλα, έπειτα από 27, 30 και

SMAC until the 42nd day. The populations of *E. coli* O157:H7 in brine, compared with those in Feta cheese during the same sampling times, were found to be significantly higher (P<0.05) until the 14th day, without significant difference (P<0.05) between 16th and 18th day and afterwards significantly different (P<0.05) until the end of storage at 12° C. The initial pH of Feta and brine decreased from 4.51 to 4.0 by the end of storage at 12° C.

Results showed that *E. coli* O157:H7 can survive in the acid environment of Feta and brine and in a pH lower than 4.5, for a long time. Previous studies showed that *E. coli* O157:H7 can survive in acid foods such as apple cider^{10,22}, mayonnaise^{8,9,23,24}, yogurt¹⁷, sausages^{12,25} for a long time. The results of the present study showed that after enrichment and subsequent striking on SMAC, the survival of *E. coli* O157:H7 was 50 days and 44 days for the Feta and 44 and 36 days for the brine stored at 4° C and 12° C, respectively. Results showed that *E. coli* O157:H7 survived longer in Feta than in brine, although the pathogen was initially mixed with the brine. Although the difference in survival time was small, the Feta cheese showed that offers better survival conditions than the brine. The fact of better performance of *E. coli* O157:H7 in Feta than in brine, was observed after the 26th day at 4° C and after the 18th day at 12° C. The significant differences (P<0.05) between the populations of *E. coli* O157:H7 in brine than in those in Feta during the initial stages of the test, may be due to the penetration of the pathogen towards the centre of cheese blocks.

The fact of penetration and balance of populations of *E. coli* O157:H7 between Feta and brine, is shown from the higher populations of *E. coli* O157:H7 up to the 6th day at 4° C and up to the 4th at 12° C, while at the same time a continuous decrease in the population of the pathogen was observed in brine.

Hudson et al.²⁶ found that *E. coli* O157:H7 decreased about 3 log from the initial populations added in milk, after 27, 30 and 27 days for white cheese in brine, Romano and Colby cheese, respectively. The white cheese in brine at the end of storage at 12° C has a pH of 4.8 and a brine with a salt content of 7%. Reitsma and Henning¹⁹ observed that *E. coli* O157:H7 survived in Cheddar cheese during preparation and storage at 4° C, either with a high inoculum (10³ log₁₀ CFU/ml) or a low inoculum (1 log₁₀ CFU/ml). Dineen et al.¹⁷ reported that *E. coli* O157:H7 survived for 12 days in yogurt (pH 4.0), 28 days in sour cream (pH 4.3) and was found to have >10² log₁₀ CFU/ml cells on the 35th day in butter milk (pH 4.1), when these products were contaminated with 10³ log₁₀ CFU/ml of the pathogen. Chang et al.²⁷ found that in fermented sour milk (pH 3.5), the *E. coli* O157:H7 survived for 1 day at 7° C, while addition of sugar in various percentage in the same product, the pathogen survived for 6-10 days. Kasrاده and Genigeorgis²⁸ studied the survival of *E. coli* O157:H7 in Spanish soft cheese (Queso Fresco) with a pH 6.6 and found that the pathogen could grow at a temperature of 10° C, while did not grow at 8° C.

27 μέρες για το λευκό τυρί άλμης, τυρί Romano και τυρί Colby, αντίστοιχα. Το λευκό τυρί άλμης στο τέλος της συντήρησης στους 12 °C είχε pH 4.8 και η άλμη που χρησιμοποιήθηκε περιείχε χλωριούχο νάτριο σε ποσοστό 7%. Οι Reitsma και Henning¹⁹ παρατήρησαν ότι η *E. coli* O157:H7 επέζησε σε τυρί Cheddar στη διάρκεια της παρασκευής και της συντήρησής του στους 4 °C είτε χρησιμοποιήθηκε μεγάλος αριθμός (10³ log₁₀ CFU/ml) είτε μικρός αριθμός (1 log₁₀ CFU/ml). Ο Dineen και συν.¹⁷ αναφέρουν ότι η *E. coli* O157:H7 επιβίωσε για 12 μέρες σε γιαούρτι (pH 4.0), 28 μέρες σε όξινη κρέμα (pH 4.3) και βρισκόταν να έχει >10² log₁₀ CFU/ml την 35η μέρα σε βουτυρόγαλα (pH 4.1), όταν τα προϊόντα αυτά είχαν επιμολυνθεί αρχικά με 10³ log₁₀ CFU/ml κύτταρα του βακτηρίου. Ο Chang και συν.²⁷ βρήκαν ότι σε ζυμούμενο οξύγαλα (pH 3.5) η *E. coli* O157:H7 επέζησε για 1 μέρα στους 7 °C, ενώ με την προσθήκη ζάχαρης σε διάφορες αναλογίες στο ίδιο προϊόν, ο παθογόνος αυτός μικροοργανισμός επέζησε 6-10 μέρες. Οι Kasradeh και Genigeorgis²⁸ μελέτησαν την επιβίωση της *E. coli* O157:H7 σε ισπανικό μαλακό τυρί (Queso Fresco) με pH 6.6 και βρήκαν ότι το παθογόνο αυτό στέλεχος κατάφερε να αναπτυχθεί στην ελάχιστη θερμοκρασία των 10 °C, ενώ δεν αναπτύχθηκε στους 8 °C.

Οι Ingham και συν.²⁹ μελέτησαν την επιβίωση της *E. coli* O157:H7 σε πρότυπες άλμες με ή χωρίς την προσθήκη παστεριωμένου τυρογάλακτος 2% και του χλωριούχου νατρίου σε ποσοστό 23% με pH 5.7 καθώς και σε εμπορικές άλμες που χρησιμοποιούνταν για την εμβάπτιση σκληρών τυριών με ποσοστό χλωριούχου νατρίου κυμαινόμενο από 22.1% μέχρι 29.3% και pH κυμαινόμενο από 5.3 μέχρι 5.7. Η *E. coli* O157:H7 επεβίωσε σε όλες τις άλμες σε θερμοκρασία 4 °C και στις 35 μέρες που διήρκεσε το πείραμά τους, παρουσίασε πτώση κυμαινόμενη από 1 μέχρι 3 log₁₀ CFU/ml. Στην παρούσα έρευνα, ο μεγαλύτερος ρυθμός θανάτου της *E. coli* O157:H7 που παρατηρήθηκε στην άλμη κατά τη συντήρησή της φέτας στους 4 °C σε σχέση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της έρευνας που προαναφέρθηκε, θα μπορούσε να οφείλεται στο χαμηλότερο pH (<4.5) της άλμης σε σχέση με το pH (>5.3) των αλμών που εξετάσαν οι ανωτέρω ερευνητές. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία και με τα συμπεράσματά τους, ότι το χαμηλό pH των άλμων είχε μεγάλη επίδραση στο ρυθμό θανάτου του παθογόνου αυτού βακτηρίου. Από προηγούμενες μελέτες φαίνεται ότι η *E. coli* O157:H7 παρουσιάζει μεγαλύτερη αντοχή σε μεγάλες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου σε σχέση με άλλα στελέχη της *E. coli*^{30,31}. Ο Glass και συν.³⁰ έδειξαν ότι ο μικροοργανισμός αυτός μπορούσε να αναπτυχθεί σε ζωμό (TSB) με περιεκτικότητα σε NaCl ≤ 6.5%. Ο Ryu και συν.³¹ έδειξαν ότι η *E. coli* O157:H7 ήταν ανιχνεύσιμη με πληθυσμούς >2.0 log₁₀ CFU/g σε σκόνη βοδινού κρέατος με χλωριούχο νάτριο (0.5 - 20%) και pH από 4.6 μέχρι 9 με γαλακτικό οξύ για διάστημα μεγαλύτερο των 3 εβδομάδων. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι η επιβίωση της *E. coli* O157:H7 ήταν μεγαλύτερη στη φέτα και στην άλμη κατά τη συντήρησή της σε θερμοκρασία 4 °C παρά στους 12 °C. Το φαινόμενο της καλύτερης επι-

Ingham et al.²⁹ studied the survival of *E. coli* O157:H7 in test brines with or without addition of pasteurized whey 2% and sodium chloride at 23% with a pH 5.7, as well as in commercial brines used for immersion of hard cheeses with a salt content from 22.1% to 29.3% and a pH ranged from 5.3 to 5.7. *E. coli* O157:H7 survived in all brines at a temperature of 4 °C, and the pathogen showed a decrease ranged from 1 to 3 log₁₀ CFU/ml during the 35 days of their tests. In the present study the higher death rate of *E. coli* O157:H7 in brine during storage at 4 °C than these of their work, may be due to lower pH (<4.5) in brine compared to pH (>5.3) in their brines. This is in accordance with their conclusions, that the low pH in brines affected the decrease rate of the pathogen. Previous studies showed that *E. coli* O157:H7 is more resistant in high concentration of sodium chloride than other serotypes of *E. coli*^{30,31}. Glass et al.³⁰ showed that this pathogen can grow in TSB broth with a salt content ≤6.5%. Ryu et al.³¹ showed that *E. coli* O157:H7, was detectable with populations >2.0 log₁₀ CFU/g in beef meat powder with sodium chloride (0.5 - 20%) and pH from 4.6 to 9 with lactic acid for more than 3 weeks. Results of present study showed that survival of *E. coli* O157:H7 was greater in Feta and brine at a storage temperature of 4 °C than of 12 °C. The phenomenon of better performance of *E. coli* O157:H7 at refrigerated temperatures (0-4 °C), than at higher temperatures, was observed by other workers in various products such as mayonnaise^{23,24}, apple cider²², soya sauce³² and cheese brines²⁹, as well as in other pathogens e.g. *Listeria monocytogenes*³³.

The pH (4.0) in Feta and brine by the end of storage at 12 °C was lower than the pH in Feta and brine (4.44) by the end of storage at 4 °C. The higher decrease in pH of Feta cheese and brine at 12 °C, than this at 4 °C, might be due to residual activity of lactic acid bacteria. The lower pH in Feta and brine during storage at 12 °C than this at 4 °C, may explain the higher decrease in numbers of *E. coli* O157:H7 by the end of storage at 12 °C than this at 4 °C. However, it was observed that products with stable low pH, such as mayonnaise^{23,24} show higher survival at refrigerated temperatures than at ambient temperatures. Duffy et al.³⁴ concluded that the effect of pH in decrease of *E. coli* O157:H7 depends on the temperature with a higher effect during storage at higher temperatures.

The results showed that *E. coli* O157:H7 survived for almost 50 days in Feta cheese with a pH lower than 4.6 and this pH value may be inhibitory for growth and survival of certain pathogens^{33,35,36}. It is important to note that the infective dose of *E. coli* O157:H7 is very low with 10-40 CFU/ml and this infective dose of the pathogen may be dangerous for the consumer^{3,5}.

Therefore, the manufacturers and handlers (sellers, packagers etc.) of Feta must be careful and avoid infection of this traditional Greek cheese with *E. coli* O157:H7. The environment in a dairy industry should not be considered as free from the presence of this pathogen, since *E. coli* O157:H7 can be traced in the incoming milk³⁷. Certain cases

βίωσης της *E. coli* O157:H7 σε θερμοκρασίες ψύξης (0-4 °C), σε σχέση με άλλες υψηλότερες θερμοκρασίες, έχει παρατηρηθεί και απο άλλους ερευνητές σε άλλα προϊόντα, όπως στη μαγιονέζα^{23,24}, το χυμό μήλου²², τη σάλτσα σόγιας³² και τις άλλες σκληρών τυριών²⁹, όπως και σε άλλα παθογόνα βακτήρια, π.χ. *Listeria monocytogenes*.³³

Το pH (4.0) της φέτας και της άλμης στο τέλος της συντήρησης στους 12 °C ήταν μικρότερο από το αντίστοιχο pH (4.44) στο τέλος της συντήρησης στους 4 °C. Η μεγαλύτερη πτώση του pH της φέτας και της άλμης στη συντήρηση στους 12 °C, σε σχέση με εκείνη της συντήρησης στους 4 °C, θα μπορούσε να οφείλεται στην υπολειμματική-περαιτέρω δράση (residual activity) των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το χαμηλότερο pH της φέτας και της άλμης στη συντήρηση στους 12 °C σε σχέση με τους 4 °C, θα μπορούσε να εξηγήσει τη μεγαλύτερη μείωση του αριθμού της *E. coli* O157:H7 στο τέλος της συντήρησης στους 12 °C σε σχέση με εκείνη στους 4 °C, αλλά έχει βρεθεί ότι προϊόντα με σταθερό χαμηλό pH, όπως η μαγιονέζα^{23,24} παρουσιάζουν καλύτερη επιβίωση σε θερμοκρασίες ψύξης παρά σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Ο Duffy και συν.³⁴ κατέληξαν ότι η δράση του pH στη μείωση της *E. coli* O157:H7 εξαρτάται σημαντικά από τη θερμοκρασία και ότι παρατηρείται αύξηση της δράσης αυτής με τη συντήρηση σε υψηλές θερμοκρασίες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε pH της φέτας με τιμή κατώτερη του 4.6 (τιμή απαγορευτική για την ανάπτυξη και επιβίωση πολλών παθογόνων βακτηρίων)^{33,35,36}, η *E. coli* O157:H7 επέζησε στη φέτα μέχρι και 50 μέρες. Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η μόλυνουσα δόση του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού είναι πολύ μικρή και της τάξης των 10-40 CFU/ml και ότι με τη δόση αυτή η *E. coli* O157:H7 μπορεί να καταστεί επικίνδυνη για την υγεία του καταναλωτή^{3,5}.

Επομένως, οι παρασκευαστές και οι χειριστές (μεταποιητές, πωλητές κλπ) της φέτας θα πρέπει να προσέχουν ώστε να μη μολύνεται το παραδοσιακό μας τυρί από τον ισχυρό αυτό μολυσματικό παράγοντα. Το περιβάλλον ενός εργοστασίου γαλακτοκομικών προϊόντων δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι απαλλαγμένο από την *E. coli* O157:H7 επειδή ο παθογόνος αυτός μικροοργανισμός μπορεί να ανευρεθεί στο προσκομιζόμενο γάλα³⁷. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Cross-contamination) παστεριωμένου γάλακτος από απαστερίωτο γάλα που δημιούργησαν σοβαρά προβλήματα υγείας και θανάτους σε καταναλωτές⁵. Μέτρα ορθής παραγωγικής διαδικασίας (Good Manufacturing Practice) και προγράμματα ανάλυσης και ελέγχου κρίσιμων σημείων (HACCP) πρέπει να εφαρμόζονται σε τυροκομεία, συσκευαστήρια, ψυγεία κλπ για να αποφευχθεί η επιμόλυνση της φέτας με την *E. coli* O157:H7. □

of cross contamination of pasteurized with unpasteurized milk have been reported, which resulted in serious health problems and deaths of consumers⁵. In order to eliminate contamination of Feta cheese with *E. coli* O157:H7, good manufacturing practice (GMP) and programs of hazard analysis critical control points (HACCP) must be applied to dairies, packaging companies, commercial refrigerators etc. □

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

1. Taylor M. The hemolytic uraemic syndrome: a clinical perspective. *PHLS Microbiol Digest* 1990, 7: 133-140.
2. Karmali MA. Infection by verocytotoxin - producing *Escherichia coli*. *Clinical and Microbiological Review* 1989,2: 15-38.
3. Blackburn CW, McCarthy JD. Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Inter J Food Microbiol* 2000, 55: 285-290.
4. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Herbert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 1983, 308: 681-685.
5. Upton P, Coia, JE Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with pasteurized milk supply. *Lancet* 1994,344: 1015.
6. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol* 1987,53:2394-2396.
7. Wang G, Zhao T, Doyle MP. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Unpasteurized and pasteurized milk. *J Food Prot* 1997,57:610-613.
8. Zhao T, Doyle MP. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *J Food Prot* 1994, 57: 780-783.
9. Erickson JP, Stamer JW, Hayes M, McKenna DN, Van Alstine LA. An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs in environmental sources, and behavior in low-pH dressings. *J Food Prot* 1995,58:1059-1064.
10. Tortorello ML, Reineke KF, Stewart DS, Raybourne RB. Comparison of methods for determining the presence of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J Food Prot* 1998, 61:1425-1430.
11. Bisser RE, Lett SM, Weber JT, Doyle MP, Barret TJ, Wells JG, Griffin PM. An outbreak diarrhoea and haemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh pressed apple cider. *JAMA* 1993, 269: 2217-2220.
12. Calicioglu M, Faith NG, Buege DR, Luchansky JB. Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented semidry low-temperature cooked beef summer sausage. *J Food Prot* 1997, 60:1158-1162.
13. Morgan D, Newman CP, Hutchinson DN, Walker AM, Rowe B, Majid F. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with the consumption of yogurt. *Epidemiol Infect* 1993, 111:181-187.
14. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *Appl Environ Microbiol* 1996,34:431-433.
15. Bielaszewska M, Janda J, Blahova K, Minarakova H, Jikova E, et al. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol Infect* 1997,119: 299-305.
16. Farrag SA, El-Gazzar FE, Marth EH. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 or *Yersinia enterocolitica* at 4 ° or 7 °C in raw milk inoculated with a commercial culture of lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft* 1992,47:149-151.
17. Dinneen S S, Takeuchi K, Soudah JE, Boor K J. Persistence of

- Escherichia coli O157:H7 in dairy fermentation systems. *J Food Prot* 1998, 61: 1602-1608.
18. Arocha MM, Mevey M, Loder S D, Rupnow JH, Bullerman L. Behavior of hemorrhagic Escherichia coli O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. *J Food Prot* 1992,55: 379-381.
 19. Reitsma CJ, Henning DR. Survival of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 during the manufacture and curing of cheddar cheese. *J Food Prot* 1996, 59: 460-464.
 20. Bradley RL, Arnold J E, Barbano JDM, Semerad RG, Smith DE, Vines BK. Chemical and physical methods, ch15. In: Standard methods for the examination of dairy products.(ed. Marshal,RT), 16th ed. American Public Health Association, Washington, DC., USA. (1993) .
 21. The Food and Beverage Code. 1994. Newspaper of the Government of the Republic of Greece. Athens. 11 January 1994.
 22. Miller LG, Kaspar CW. Escherichia coli O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J Food Prot* 1994,57: 460-464.
 23. Raghubeer ER, Ke JS, Campbell ML, Meyer RS. Fate of Escherichia coli O157:H7 and other coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. *J Food Prot* 1995, 58: 13-18.
 24. Weagant SD, Bryant JL, Bark DH. Survival of Escherichia coli O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *J Food Prot* 1994, 57:629-131.
 25. Clavero MRS, Beuchat LR. Survival of Escherichia coli O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62: 2735-2740.
 26. Hudson LM, Chen J, Hill AR, Griffiths MW. Bioluminescence: A rapid indicator of Escherichia coli O157:H7 in selected yogurt varieties. *J Food Prot* 1997, 60:891-897.
 27. Chang J, Chou C, Li C. Growth and survival of Escherichia coli O157:H7 during the fermentation and storage of diluted cultured milk drink. *Food Microbiol* 2000,17:579-587.
 28. Kasrazadeh M, Genigeorgis C. Potential growth and control of Escherichia coli O157:H7 in soft hispanic type cheese. *Inter J Food Microbiol* 1995, 25:289-300.
 29. Ingham SC, Su Y, Spangenberg DS. Survival of Salmonella typhimurium and Escherichia coli O157:H7 in cheese brines. *Inter J Food Microbiol* 2000, 63:73-79.
 30. Glass KA, Loeffelholz JM, Ford PJ, Doyle MP. Fate of Escherichia coli O157:H7 as affected by pH or Sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl Environ Microbiol* 1992, 58: 2513-2516.
 31. Ryu JH, Deng Y, Beuchat LR. Survival of Escherichia coli O157:H7 in dried beef powder as affected by water activity, sodium chloride content and temperature. *Food Microbiol.* 1999, 16:309-316.
 32. Masuda S, Hara-Kudo Y, Kumagai S. Reduction of Escherichia coli O157:H7 populations in soy sauce a fermented seasoning. *J Food Prot* 1998, 61: 657-661.
 33. Papageorgiou DK, Marth EH. Fate of Listeria monocytogenes during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. *J Food Prot* 1989,52:82-87.
 34. Duffy G, Whiting RC , Sheridan JJ. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of Escherichia coli O157:H7. *Food Microb* 1999,16:299-307.
 35. Karaioannoglou P, Koidis P, Papageorgiou D, Mantis A. Survival of Yersinia enterocolitica during the manufacture and storage of Feta cheese. *Milchwissenschaft* 1985, 40:204-206.
 36. Panetsos, A., S.A. Georgakis, A. Mantis and P. Karaioannoglou. 1971. Survival of Brucella melitensis in experimental contaminated Feta cheese. *Proc. 4th National Microbiol. Congr. Athens, Greece.* P. 171.
 37. Padhye NV, Doyle MP. Escherichia coli O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods of detection in food. *J Food Prot* 1992,55:555-565.