

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΧΡΗΣΗΣ ΝΕΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΤΗΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»**

ΒΑΙΑ Χ. ΓΕΡΟΚΟΜΟΥ

ΤΕΧΝ. ΓΕΩΠΟΝΟΣ MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

Η έγκριση της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων της συγγραφέως (Ν. 5343/1932. Άρθρο 202, παρ.2).

Στην οικογένειά μου

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: 893/ 15-09-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Κωνσταντούλα Ακρίδα – Δεμερτζή, Αφ. Αν. Καθηγήτρια, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μέλη:

Ευγενία Μπεζιρτζόγλου, Καθηγήτρια, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Κουρκουτάς Ιωάννης, Αν. Καθηγητής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 17-10-2014

Θέμα: «Διερεύνηση Χρήσης Νέν Θρεπτικών Υποστρωμάτων και Χρωστικών στον Τομέα της Μικροβιολογίας Τροφίμων» .

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Συνέλευση: 1060/20-05-2022

1. Ευγενία Μπεζιρτζόγλου, Καθηγήτρια, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
2. Κουρκουτάς Ιωάννης, Αν. Καθηγητής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
3. Μαρία-Ελένη Λέκκα, Καθηγήτρια, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
4. Σταύρος Πλέσσας, Αν. Καθηγητής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
5. Σπυρίδων Ντούγιας, Αν. Καθηγητής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
6. Χρυσούλα Βόιδαρου, Αν. Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
7. Χριστίνα Τσίγαλου, Επ. Καθηγήτρια, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 22-07-2022

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ξανθή Τουτουτζόγλου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Την εποπτεία και καθοδήγηση της διατριβής είχε η Αφυπηρετήσασα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Ακρίδα – Δεμερτζή Κωνσταντούλα, προς την οποία θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες, για την πολύτιμη βοήθειά της στην προετοιμασία και οργάνωση της διατριβής, την ακούραστη παρακολούθησή της, τη διαρκή υποστήριξη και την πρόθυμη και υπομονετική καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής μου.

Θέλω να αναφερθώ στην κ. Μπεζιρτζόγλου Ευγενία, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας – Μικροβιακής Οικολογίας του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης και στον κ. Κουρκουτά Ιωάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή Εφαρμοσμένης Βιοτεχνολογίας του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τους οποίους ευχαριστώ θερμά για τις εύστοχες υποδείξεις τους και την αρμονική συνεργασία μας.

Ευχαριστώ επίσης τον Ομότιμο Καθηγητή Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Δεμερτζή Παναγιώτη, για την άψογη συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την κ. Βοϊδάρου Χρυσούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιακής Οικολογίας - Δημόσιας Υγείας του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης και συγγραφής της παρούσας μελέτης.

Τέλος, ευχαριστώ τα άτομα που στάθηκαν και στέκονται δίπλα μου συνεχώς σε κάθε βήμα της ζωής μου με αγάπη και υπομονή με στηρίζουν στις αποφάσεις μου, ο λόγος βέβαια για την οικογένειά μου, την οποία ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
1.	ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	6
1.1	Εισαγωγή	6
1.2	Προέλευση των μικροβιολογικών καλλιεργητικών μέσων	7
1.3	Η εξέλιξη των θρεπτικών υποστρωμάτων	12
1.4	Ιδιότητες θρεπτικών υποστρωμάτων	17
1.5	Βασικά συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων	22
1.6	Κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων	27
1.6.1	Υγρά	27
1.6.2	Στερεά	28
1.6.3	Ημίρρευστα	28
1.7	Τεχνικές προδιαγραφές των θρεπτικών υποστρωμάτων	34
1.8	Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων	35
2.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΝΝΟΙΑ ΤΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ	38
2.1	Εισαγωγή	38
2.2	Τεχνικές χρώσης	39
2.3	Απλές τεχνικές χρώσης	39
3.	ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	43
3.1	Εισαγωγικά στοιχεία	45
3.2	Μικροβιολογία νωπού γάλακτος	45
3.2.1	Γενικά για το γάλα	45
3.2.2	Σύσταση γάλακτος	48
3.2.2.1	Χημική σύσταση του γάλακτος προβάτου/αίγας	50
3.2.3	Το γάλα ως τρόφιμο	51
3.2.4	Η προέλευση των μικροοργανισμών που απαντούν στο γάλα - Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά και υγιεινή	53
3.2.4.1	Κυριότερα γένη βακτηρίων που μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης γάλακτος	58

4.	ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΥΤΗΣ ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ	62
4.1	Ιστορία της παστερίωσης	62
4.2	Μέθοδοι για τον προσδιορισμό της θερμικής αντοχής παθογόνων βακτηρίων και της ερμηνείας των δεδομένων	64
4.3	Ικανότητα παθογόνων βακτηρίων να επιβιώσουν στην παστερίωση	65
4.4	Επιδημιολογικά στοιχεία σχετικά με τις εστίες νόσησης που συνδέονται με την κατανάλωση παστεριωμένου γάλακτος	68
4.5	Συνολικά συμπεράσματα όσον αφορά τις παραδοσιακές επεξεργασίες παστερίωσης	69
5.	ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ – ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΥΤΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΙΕΙΝΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	71
5.1	Αλκαλική φωσφατάση (ALP)	72
5.2	Περιορισμός των αναλύσεων ALP	74
5.2.1	Συνθετικοί παράγοντες	74
5.2.2	Χημικές ενώσεις και συνθήκες παρεμβολής	75
5.2.3	Μικροβιακή αλκαλική φωσφατάση	76
5.3	Επανενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης	78
5.4	Μέθοδοι προσδιορισμού της αλκαλικής φωσφατάσης	81
5.4.1	Ποσοτικός προσδιορισμός αλκαλικής φωσφατάσης στο γάλα	85
5.4.1.1	Με τη χρήση Λουμινόμετρου	85
5.4.1.2	Με τη χρήση Φασματοφωτόμετρου	85
5.4.2	Ποιοτικός προσδιορισμός φωσφατάσης στο γάλα	86
6.	ΟΛΙΚΑ ΣΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	87
6.1	Εισαγωγικά στοιχεία – Μικροβιολογική προσέγγιση του γάλακτος	87
6.2	Πηγές μόλυνσης του γάλακτος	89
6.3	Μικροβιακή ποιότητα του γάλακτος – Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)	91

6.3.1	Προσδιορισμός της μόλυνσης του γάλακτος	91
6.4	Σωματικά κύτταρα γάλακτος	101
6.4.1	Τροποποίηση του Αριθμού Σωματικών Κυττάρων (ΑΣΚ)	102
6.4.2	Καταμέτρηση του Αριθμού Σωματικών Κυττάρων (ΑΣΚ)	103
7.	ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ - ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	109
8.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	110
8.1	Υλικά	110
8.1.1	Δείγματα προς ανάλυση παστεριωμένου γάλακτος	110
8.1.2	Δείγματα προς ανάλυση νωπού γίδινου γάλακτος	113
8.1.3	Χημικά αντιδραστήρια	115
8.1.4	Λοιπά υλικά	116
8.2	Περιγραφή του νεοσύστατου τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»	117
8.2.1	Χημικός μηχανισμός δράσης της μεθόδου που χρησιμοποιεί το τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»	117
8.2.2	Περιεχόμενα των αντιδραστηρίων του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»	117
8.2.3	Τρόπος χρήσης του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»	118
8.3	Τεχνική δειγματοληψίας ανα φάση εξέλιξης της έρευνας	119
8.3.1	Προετοιμασία δειγμάτων	119
8.3.1.1	Τεχνική χειρισμού και ομογενοποίησης των δειγμάτων ανά φάση εξέλιξης της έρευνας	119
8.3.1.2	Παρασκευή επιμολυσμένων με φωσφατάση νέων δειγμάτων	121
8.3.1.3	Αναγνώριση των αποτελεσμάτων	122
9.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	125
9.1	Αποτελέσματα	125
9.2	Διακρίβωση αποτελεσμάτων τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»	130
9.3	Συζήτηση – Συμπεράσματα	179
10.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 2	182

10.1	Εισαγωγή	182
10.2	Υλικά και μέθοδοι	183
10.3	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	206
10.4	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	207
10.5	ABSTRACT	209
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	210

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

1.1 Εισαγωγή

Η ανακάλυψη των καλλιεργητικών μέσων επέτρεψε την ανάπτυξη της επιστήμης της μικροβιολογίας τον 19^ο αιώνα (Wainwright et al 1992). Η βακτηριακή καλλιέργεια ήταν η πρώτη μέθοδος που αναπτύχθηκε για τη μελέτη της μικροχλωρίδας του ανθρώπου (Lagier et al 2015), με τη χρήση ενός τεχνητού μέσου που επιτρέπει την ανάπτυξη και την απομόνωση των βακτηρίων. Πρώτος ο Louis Pasteur το 1860 κατάφερε πρακτικά να απομονώσει διαφορετικά είδη μικροοργανισμών και να επινοήσει τον τρόπο διατήρησης και επιλογής τους στο εργαστήριο χάρη στην ανάπτυξη του πρώτου τεχνητού μέσου καλλιέργειας (Prescott et al 2018).

Στη δεκαετία του 1970, καινοτόμες μοριακές τεχνικές, όπως η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – Polymerase Chain Reaction (PCR), η Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς και συγκεκριμένα η μεταγονιδιωματική, εφαρμόστηκαν από τους μικροβιολόγους εις βάρος της τεχνικής καλλιέργειας μικροοργανισμών. Παρ όλα αυτά, η μεταγονιδιωματική μελέτη παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, λόγω της έλλειψης ευαισθησίας των εκκινητών που χρησιμοποιούνται, με αποτέλεσμα η ανίχνευση βακτηρίων σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 10⁵ cfu/g δείγματος να καθίσταται δύσκολη (Lagier et al 2015). Επιπλέον, αυτές οι τεχνικές ανιχνεύουν μόνο το DNA, καθιστώντας αδύνατη τη διαφοροποίηση του DNA των ζωντανών βακτηρίων από εκείνο των παροδικών ή των νεκρών βακτηρίων.

Πριν από λίγα χρόνια, μια νέα τεχνική καλλιέργειας αναπτύχθηκε αυτή των Culturomics, η οποία χρησιμοποιεί πολύ μεγάλο αριθμό μέσων και συνθηκών καλλιέργειας για την διεύρυνση της μελέτης των βακτηρίων και συμπληρώνει τη μεταγονιδιωματική μελέτη. Ως εκ τούτου, η ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών ενός μικροβιώματος μέσω της μεταγονιδιωματικής μελέτης μπορεί να αξιοποιηθεί από τα Culturomics μέσω της βελτιστοποίησης νέων εξειδικευμένων μέσων καλλιέργειας για την απομόνωση αυτών των ειδών και μέσω αυτής της συμπληρωματικότητας τα culturomics μπορεί να αποτελέσουν στοχευμένη τεχνική.

Τα νέα μέσα καλλιέργειας μιμούνται σήμερα το φυσικό περιβάλλον των βακτηρίων με την προσθήκη διαφορετικών στοιχείων στο μέσο καλλιέργειας με σκοπό την ανάπτυξη βακτηρίων, τα οποία στο παρελθόν δεν είχαν καλλιεργηθεί. Τα τελευταία χρόνια, η τεχνική καλλιέργειας με τη χρήση νέων μέσων καλλιέργειας και νέων συνθηκών

καλλιέργειας συνεισφέρει στην απομόνωση νέων βακτηριακών ειδών. Αυτό καταδεικνύει ότι, παρά την εγκατάλειψη της καλλιέργειας από μεγάλο αριθμό μικροβιολόγων, τα μέσα καλλιέργειας παραμένουν θεμελιώδες εργαλείο για την απομόνωση κοινών αλλά και παθογόνων βακτηρίων.

1.2 Προέλευση των μικροβιολογικών καλλιεργητικών μέσων

Η διαγνωστική βακτηριολογία και μυκητολογία απαιτούν τη μελέτη μικροοργανισμών στο εργαστηριακό περιβάλλον. Πολλά βακτήρια και μύκητες μπορούν να καλλιεργηθούν σε καλλιεργητικά μέσα τα οποία έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να παρέχουν θρεπτικές συνθήκες παρόμοιες με το φυσικό περιβάλλον στο οποίο ένας μικροοργανισμός συνήθως επιβιώνει και αναπαράγεται (Collins 1967). Ο όρος καλλιεργητικό μέσο χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια σύνθετη ή συνθετική ουσία (χημικά καθορισμένη) που βρίσκεται είτε σε υγρή μορφή (ζωμός) είτε σε στερεά μορφή (όπως το άγαρ σε τρυβλίο Petri) (Denyer et al 2004).

Η καλλιέργεια μικροοργανισμών σε μέσα καλλιέργειας εξαρτάται από πολλούς σημαντικούς παράγοντες που περιλαμβάνουν έναν βέλτιστο συνδυασμό θρεπτικών ουσιών, οξυγόνου ή άλλων αερίων, υγρασίας, pH και θερμοκρασίας. Σημαντικά θρεπτικά συστατικά είναι οι πηγές άνθρακα, αζώτου, ανόργανων φωσφορικών και θείου, ιχνοστοιχείων, νερού και βιταμινών. Τα θρεπτικά συστατικά λειτουργούν ως «αυξητικοί παράγοντες». Είναι μια φυσική ουσία, όπως ένα αμινοξύ, το οποίο είναι ικανό να διεγείρει την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση.

Παρά τη σημασία των καλλιεργητικών μέσων, λίγα δεδομένα υπάρχουν όσον αφορά την εξέλιξή τους και ακόμη λιγότερα σχετικά με την συνεισφορά τους στην ανάπτυξη της εργαστηριακής μικροβιολογίας όπως είναι σήμερα διαμορφωμένη. Η προέλευση των μικροβιολογικών καλλιεργητικών μέσων συμπίπτει με την πρόοδο της βακτηριολογίας ενώ η εξέλιξή τους συμπίπτει με την σταθερή πρόοδο της βακτηριολογίας τα τελευταία εκατό πενήντα χρόνια. Ενώ τα καλλιεργητικά μέσα μικροβιολογίας αποτελούν αναλώσιμα ρουτίνας των μικροβιολογικών εργαστηρίων, προκύπτουν συνεχώς καινοτομίες μέσω της παρασκευής νέων μέσων στα πλαίσια της ανάδειξης νέων στελεχών σε συνδυασμό με γρήγορες και προηγμένες μικροβιολογικές μεθόδους.

Η προέλευση των μικροβιολογικών καλλιεργητικών μέσων συμπίπτει με την επιστήμη της βακτηριολογίας τον 19ο αιώνα. Κατά τη διάρκεια αυτής της πρώιμης περιόδου οι βακτηριολόγοι προσπάθησαν να καλλιεργήσουν μικροοργανισμούς, είτε απευθείας χρησιμοποιώντας υλικά, είτε ενώσεις αυτών, στα οποία είχε παρατηρηθεί για

πρώτη φορά ο μικροοργανισμός. Τα μέσα αυτά ήταν κυρίως ζωμοί με βάση το βόειο κρέας άγνωστης και μεταβλητής σύνθεσης (Sandle 2011). Αναμφισβήτητα ο πρώτος που καλλιέργησε μικροοργανισμούς σε καλλιεργητικό μέσο με αξιόλογο βαθμό αναπαραγωγιμότητας, ήταν ο Γάλλος χημικός και μικροβιολόγος Louis Pasteur (1822-1895). Όντας διευθυντής επιστημονικών μελετών στο *École Normale* το 1860 και έχοντας ως στόχο τη δημιουργία ενός μέσου ζύμωσης, παρασκεύασε ένα θρεπτικό μέσο αποτελούμενο από ζύμες, τέφρα, σάκχαρα και άλατα αμμωνίου (Tseng 1946). Αυτό το μέσο κάλυπτε τις βασικές προϋποθέσεις σχετικά με την βακτηριακή ανάπτυξη και τα συστατικά του περιλάμβαναν άζωτο (άλατα αμμωνίου), πηγές άνθρακα (σάκχαρα) και βιταμίνες. Κατά την μελέτη λοιπόν αυτού του μέσου, ο Pasteur έκανε σημαντικές παρατηρήσεις όπως: συγκεκριμένα συστατικά του μέσου μπορούν να προωθήσουν ή να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη οποιουδήποτε μικροοργανισμού και ότι μεταξύ των διαφορετικών μικροοργανισμών υφίσταται ανταγωνισμός, ο οποίος μπορεί να οδηγήσει στην κυριαρχία κάποιων ειδών σε μία καλλιέργεια.

Ο Ferdinand Cohn στη συνέχεια δημιούργησε ένα πιο ευέλικτο καλλιεργητικό μέσο το οποίο αποτελούνταν από ποικιλία σακχάρων. Ακολούθησε ευρύτερη εφαρμογή των καλλιεργητικών μέσων και μεγαλύτερη επιτυχία παρατηρήθηκε, όταν ο Robert Koch (1843-1910) ανακάλυψε ότι οι ζωμοί που αποτελούνταν από φρέσκο ορό βοείου κρέατος ή εκχυλίσματα κρέατος (τα λεγόμενα bouillons - μπουλόνια), οδήγησαν σε βέλτιστη βακτηριακή ανάπτυξη (Koch 1876).

Σημαντική εξέλιξη αποτέλεσε η μετάβαση από τα υγρά μέσα καλλιέργειας στα στερεά μέσα. Το 1881 ο Robert Koch στο Διεθνές Ιατρικό Συνέδριο στο Λονδίνο, επέδειξε μια νέα τεχνική την οποία ο Παστέρ φέρεται να αποδέχεται χρησιμοποιώντας την έκφραση: "C'est un grand progres" (Sakula 1982). Ο Koch λοιπόν αφού διαπίστωσε τις δυσκολίες κατά τη χρήση των υγρών καλλιεργητικών μέσων (ζωμών) για την επίτευξη καθαρών καλλιεργειών κατευθύνθηκε στην εναλλακτική λύση της χρήσης στερεών καλλιεργητικών μέσων (αυτή η έρευνα ήταν καθοριστική για την απομόνωση του βακτηρίου *Bacillus anthracis*, αιτιολογικού παράγοντα του βακίλου του άνθρακα). Αρχικά, ο R. Koch αξιολόγησε μέσα όπως η λευκωματίνη του αυγού, η πάστα αμύλου και η άσηπτα κομμένη φέτα πατάτας (η οποία προηγουμένως είχε μελετηθεί από τον Γερμανό βιολόγο J. Schroeter (Schroeter 1872). Οι παρατηρήσεις αυτές αποδείχθηκαν σχετικά φτωχές στην ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων. Μετά από περιορισμένα, αλλά τελικά ενθαρρυντικά αποτελέσματα, ο R. Koch ανέπτυξε καλλιεργητικό μέσο που περιείχε εκχύλισμα κρέατος με προσθήκη ζελατίνης (άχρωμη ουσία προερχόμενη από το κολλαγόνο των ζώων, στις

ΗΠΑ συχνά αναφέρεται ως «Jell-O»). Η προκύπτουσα «θρεπτική ζελατίνη» μεταγγίστηκε, με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης, σε επίπεδες γυάλινες πλάκες, οι οποίες στη συνέχεια εμβολιάστηκαν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Αυτή η νέα τεχνική με τη χρήση της πλάκας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί τόσο για την επίτευξη καθαρών καλλιιεργειών βακτηρίων όσο και για την ανακαλλιέργειά τους, είτε σε νέες πλάκες είτε σε δοκιμαστικούς σωλήνες από βαμβάκι σε κεκλιμένο επίπεδο (Koch 1881). Παρά τα πλεονεκτήματα η χρήση της ζελατίνης ως στερεοποιητικού μέσου, παρουσίαζε δύο σημαντικά μειονεκτήματα: 1) Η μετατροπή της από γέλη σε υγρή κατάσταση στους 25°C αποτρέπει την επώαση των πλακών σε υψηλότερες θερμοκρασίες (πολλά κοινά βακτήρια, όπως αυτά του γένους *Staphylococcus*, έχουν βέλτιστο εύρος ανάπτυξης μεταξύ των 30-35°C). Η ευαισθησία της θερμοκρασίας προκάλεσε επίσης την τήξη του μέσου κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. 2) Υδρολύεται παρουσία του ενζύμου ζελιτινάση, (ένζυμο που παράγεται από τους περισσότερους πρωτεολυτικούς μικροοργανισμούς όπως το γένος *Clostridium*) σε διάφορες υπο-ενώσεις (πολυπεπίδια, πεπίδια και αμινοξέα) καθιστώντας το μέσο ακατάλληλο (Levine and Schoenlein 1930).

Πράγματι, το έργο του R. Koch ήταν τόσο πρωτοποριακό που συχνά σε πολλά συγγράμματα μικροβιολογίας αναφέρεται ως «Ο Πατέρας των καλλιιεργητικών Μέσων». Ένα χρόνο αργότερα, η Fannie (ή Fanny) Eilshemius (1850-1934), σύζυγος του Δρ. Walther Hesse (1846-1911) συνεργάτη του R. Koch, πρότεινε την αντικατάσταση της ζελατίνης με το άγαρ (Bridsen 1994). Η Fannie Hesse χρησιμοποιούσε το άγαρ για την παρασκευή μαρμελάδας και ζελέ φρούτων, συνταγή που έμαθε κατά την παιδική της ηλικία στη Νέα Υόρκη από έναν ολλανδό γείτονα ασιατικής καταγωγής.

Το Agar είναι υδατοδιαλυτός πολυσακχαρίτης ο οποίος λαμβάνεται από ορισμένα στελέχη θαλασσιών φυκών των οικογενειών Gelidiaceae (γελιδίτες) και Gracilariaceae της Rhodophyceae (ροδοφύκη) και αποδείχθηκε ανώτερος παράγοντας πηκτωματοποίησης (Hitchens and Leikind 1939). Το άγαρ τήκεται σε θερμοκρασία 85°C περίπου, ενώ σχηματίζει γέλη σε θερμοκρασίες μεταξύ 34-42°C (φυσική ιδιότητα που ονομάζεται υστέρηση) (Mielke and Roubicek 2003). Το άγαρ επίσης δεν προσβάλλεται από τα σακχαρολυτικά ένζυμα των βακτηρίων. Η χρήση του επιτρέπει τη δημιουργία ενός θρεπτικού μέσου ικανό να εμβολιαστεί σε θερμοκρασία 40°C δηλαδή στην τηγμένη του κατάσταση και επίσης να επωασθεί σε θερμοκρασίες έως 60°C χωρίς να υποστεί τήξη (ιδιότητα χρήσιμη στην περίπτωση μελέτης θερμοφίλων βακτηρίων). Συνήθως προστίθεται στο θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 1-12%.

Η ικανότητα ανάπτυξης βακτηρίων σε στερεά θρεπτικά υλικά αποδείχθηκε ορόσημο στην ανάπτυξη της βακτηριολογίας. Επίσης το άγαρ συνέχισε να έχει ευρύτερη εφαρμογή στην ηλεκτροφόρηση ως πήκτωμα αγαρόζης και σε δοκιμές διάχυσης. Η ανάπτυξη των βακτηρίων σε στερεά καλλιεργητικά μέσα οδήγησε τον R. Koch στη χρήση της λέξης «αποικία» ώστε για να περιγράψει την καθαρή και διακριτή ανάπτυξή τους σε αυτά (Mortimer 2001).

Μια περαιτέρω σημαντική εξέλιξη για την κατασκευή στερεών μέσων καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε το 1887 όταν ο Julius Richard Petri (1852-1921, συνεργάτης του Koch), ασχολήθηκε με την τροποποίηση της επίπεδης γυάλινης κοινής πλάκας και έφτιαξε έναν νέο τύπο καλλιεργητικού πιάτου για τα θρεπτικά υλικά, το τρυβλίο Petri (εικ. 1).

Ο J. R. Petri χρησιμοποίησε ένα ρηχό, κυκλικό γυάλινο πιάτο με ένα χαλαρό κάλυμμα για καλλιέργεια βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών, προσθέτοντας στο εσωτερικό τους καλλιεργητικό υλικό. Το βασικό χαρακτηριστικό σχεδίασης του τρυβλίου Petri ήταν η χρήση ενός προεξέχοντος πτυσσόμενου καπακιού, το οποίο ήταν σε θέση να παρεμποδίζει την είσοδο ρύπων στο εσωτερικό του, άρα και την αποφυγή επιμολύνσεων (Loeffler 1884, Brock 1998). Υπάρχει ωστόσο κάποια διαφωνία σχετικά με το αν ο J. R. Petri εφηύρε το «πιάτο Petri», ή αν αυτό εφευρέθηκε νωρίτερα από τον Σλοβένο επιστήμονα Emanuel Klein ο οποίος σε βιβλίο που δημοσιεύθηκε το 1885, αναφέρεται σε ένα σκεύος που χρησιμοποίησε για τη συγκράτηση ενός στερεού καλλιεργητικού μέσου που μοιάζει πολύ με το «πιάτο Petri». Επιπλέον, σε δημοσίευσμά του ο Άγγλος επιστήμονας Percy Frankland το 1886 αναφέρεται επίσης σε σκεύος που παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το τρυβλίο Petri. Ανεξαρτήτου προέλευσης, η συνεισφορά του τρυβλίου Petri στη μικροβιολογία ήταν και παραμένει υψίστης σημασίας (Wainright 1999). Για πολλά χρόνια χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα τρυβλία, κυρίως μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1960, όπου η εξέλιξη στην τεχνολογία χύτευσης με έγχυση οδήγησαν στην κατασκευή τρυβλίων Petri από διαφανές πλαστικό πολυστυρόλιο. Τα πρώτα αυτά πλαστικά τρυβλία ήταν πολύ βαριά, ενώ αργότερα κατά τη δεκαετία του 1970 και εν μέρει λόγω της αύξησης του κόστους του πετρελαίου, το βάρος του τρυβλίου Petri μειώθηκε προκειμένου να περιοριστεί το κόστος κατασκευής.



Εικόνα 1: α) Τυπικό τρυβλίο petri διαστάσεων 90X15mm.

β) Τυπικό τρυβλίο petri διαστάσεων 90X15mm με θρεπτικό υλικό.

Ένα θρεπτικό υλικό πρέπει να καλύπτει τις διατροφικές ανάγκες των υπό καλλιέργεια μικροοργανισμών, για αυτόν τον λόγο απαιτείται να εμπεριέχονται σε αυτό «αυξητικοί παράγοντες» (βασικές ουσίες που ο μικροοργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει από τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά). Σύμφωνα με τους Klebs το 1871 και Nagelito 1880, τα κύρια θρεπτικά συστατικά προέρχονταν από κρέας (Merck 1983, Metz 1990). Οι παραπάνω ερευνητές πρώτοι κατέγραψαν ότι τα βακτήρια παρουσιάζουν καλή ανάπτυξη σε καλλιεργητικά μέσα που περιέχουν πρωτεΐνες κρέατος ή «πεπτόνες». Οι πεπτόνες παρέχουν σε διαλυτή και αφομοιώσιμη μορφή μεγάλη ποσότητα των ανόργανων συστατικών της πρώτης ύλης καθώς και τις οργανικές πηγές άνθρακα και αζώτου. Αν και το εκχύλισμα κρέατος που χρησιμοποιήθηκε για τα πρώτα μέσα καλλιέργειας ήταν μια πλούσια πηγή πολλών από τους απαραίτητους αυξητικούς παράγοντες για τα βακτήρια, ήταν ανεπαρκές σε αμινοξέα ώστε να επιτρέψει τη βέλτιστη ανάπτυξη μικροοργανισμών. Το 1884 ο Fredrick Loeffler πρόσθεσε πεπτόνη και αλάτι στη βασική σύνθεση εκχυλίσματος κρέατος του Koch (Loeffler 1884). Η πεπτόνη που χρησιμοποιούσε ήταν προϊόν ενζυμικής πέψης του κρέατος, που χρησιμοποιούνταν κατά τον 19^ο αιώνα ως φαρμακευτικό προϊόν και συνταγογραφούνταν σε περιπτώσεις διατροφικών διαταραχών. Η πεπτόνη αυτή αποτέλεσε πηγή αμινοξέων, ενώ το άλας ρύθμιζε την οσμωτική πίεση του μέσου (Pasupuleti and Demain 2010).

1.3 Η εξέλιξη των θρεπτικών υποστρωμάτων

Η παραγωγή θρεπτικών μέσων καλλιέργειας σε βιομηχανική κλίμακα προήλθε από τη βιομηχανία κρέατος, όπου τα μέχρι τότε απορριπτόμενα υποπροϊόντα κρέατος χρησιμοποιήθηκαν στην παραγωγή μέσων καλλιέργειας. Αναμφισβήτητα εξέχον παράδειγμα ήταν ο Γερμανός βαρόνος Justus von Liebig, ο οποίος τον 19ο αιώνα, καθιέρωσε τη φήμη του ως ένας από τους πατέρες της σύγχρονης χημείας, συμβάλλοντας σημαντικά στην έρευνα και στις εφαρμογές της χημείας στους τομείς της γεωργίας, της επιστήμης των ζώων, της φαρμακολογίας και των τροφίμων. Το 1865 ιδρύθηκε η εταιρεία LEMCO (Liebig Extract of Meat Company), η οποία προώθησε τη μαζική παραγωγή και εμπορία προϊόντων εκχυλίσματος κρέατος γνωστά ως «Liebig's extract of meat», χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη κρέας βοοειδών. Το αρχικό κίνητρο του Liebig ήταν η παρασκευή εκχυλίσματος κρέατος, το οποίο θα χρησιμοποιούνταν ως συμπλήρωμα διατροφής για τους υποσιτισμένους φτωχούς της Κεντρικής Ευρώπης. Λίγο αργότερα ιδρύθηκε η εταιρεία OXO, Medical Division της LEMCO (Εικόνα 2), η οποία παρασκεύασε τον κύβο OXO, προϊόν που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή μικροβιολογικών μέσων καλλιέργειας και από το 1924 πωλούνταν σε νοσοκομεία και εργαστήρια (Bridson 1998).



Εικόνα 2: Λογότυπα της εταιρείας LEMCO.

Η κινητήρια δύναμη για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας μικροβιολογικών μέσων στο Ηνωμένο Βασίλειο αποτέλεσε, όπως συνέβη και με πολλές άλλες επιστημονικές καινοτομίες, ο δεύτερος παγκόσμιος πόλεμος και συγκεκριμένα η ίδρυση της υπηρεσίας Emergency Pathology Service (EPS), για την αντιμετώπιση των επιδημιών (McIntosh

1946). Η EPS εξελίχθηκε στο Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας (Public Health Laboratory Service - PHLS) και ο κύριος προμηθευτής μικροβιολογικών μέσων καλλιέργειας ήταν η εταιρεία OXO Medical Division. Η εταιρεία σταδιακά ανέπτυξε τα καλλιεργητικά μέσα σε μορφή αφυδατωμένης σκόνης, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη διατηρησιμότητα στο χρόνο, λόγω της χαμηλής ενεργότητας νερού, ιδιότητα που συνδέεται με μειωμένα ποσοστά εμφάνισης αλλοίωσης του θρεπτικού υλικού. Ακολούθησε μαζική παραγωγή και από άλλες εταιρείες όπως η American Agar Company στην Καλιφόρνια και η Digestive Ferments Company (Difco) (Robertson 1930).

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, σημειώθηκαν περαιτέρω εξελίξεις στην παραγωγή θρεπτικών μέσων καλλιέργειας. Τα περισσότερα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του 19^{ου} αιώνα, ήταν μη εκλεκτικά και σχεδιάστηκαν για την ανάπτυξη κοινών βακτηρίων. Το πρώτο βήμα στη χρήση των θρεπτικών υλικών στη διαγνωστική μικροβιολογία έγινε το 1888 όταν ο Martinus Beijerinck (1851 - 1931) ανέπτυξε τεχνικές για την απομόνωση μικροοργανισμών με εξειδικευμένες μεταβολικές δραστηριότητες [εργάστηκε στη δέσμευση διαφόρων στοιχείων από τους μικροοργανισμούς (κύκλοι του άνθρακα, αζώτου και θείου) στη φύση, ανακάλυψε τη δέσμευση του αζώτου από τα συμβιοτικά (*Rhizobium sp.*) και ελεύθερα βακτήρια (*Azotobacter sp.*) και απομόνωσε θειοαναγωγικά βακτήρια κλπ].

Αν και η αντιμικροβιακή δράση χημικών ουσιών όπως οι χρωστικές ήταν γνωστή από το 1885, όταν ο Paul Ehrlich δημοσίευσε μελέτες σχετικά με την ανασταλτική επίδραση των ενώσεων του αρσενικού στη σύφιλη (Ehrlich 1885), η προσθήκη τους στα θρεπτικά υποστρώματα έγινε τη δεκαετία του 1900 όταν αναπτύχθηκαν τα πρώτα επιλεκτικά μέσα. Οι πρώτοι εκλεκτικοί παράγοντες έτειναν να είναι χημικές ουσίες και χρωστικές που χρησιμοποιούνταν για άλλους σκοπούς στο εργαστήριο και βρέθηκε τυχαία να έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών. Μερικές από τις πλέον σημαντικές εξελίξεις περιελάμβαναν:

- 1905: Ο Alfred MacConkey, με έδρα το Ινστιτούτο Προληπτικής Ιατρικής του Lister στο Elstree, χρησιμοποίησε χολικά άλατα για την απομόνωση βακτηρίων που ζυμώνουν τη λακτόζη σε δείγματα κοπράνων (MacConkey 1905). Το επίπεδο σύζευξης των χολικών αλάτων καθορίζει το προφίλ επιλεκτικότητάς τους. Τα χολικά άλατα στη συζευγμένη τους μορφή είναι λιγότερο ανασταλτικά και επιτρέπουν την ανάπτυξη σταφυλόκοκκων και εντεροκόκκων, ενώ άλατα όπως το δεσοξυχολικό είναι πολύ πιο επιλεκτικά, επιτρέποντας μόνο την ανάπτυξη βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Εικόνα 3)

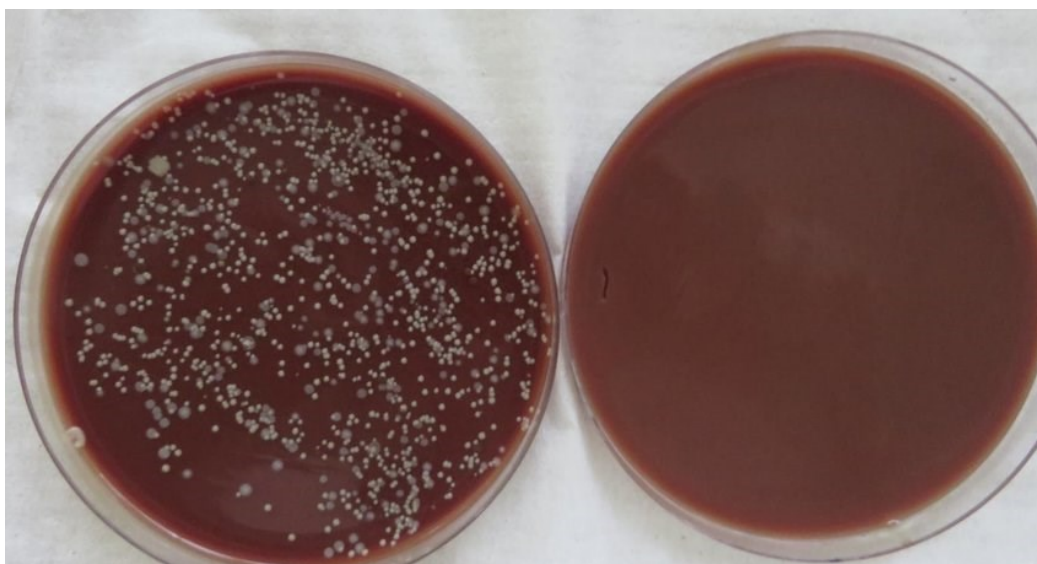


Εικόνα 3: α) Alfred Theodore MacConkey



β) Αποικίες βακτηρίων που ζυμώνουν την λακτόζη / Αποικίες βακτηρίων που δεν ζυμώνουν τη λακτόζη.

- 1912: Ο Churchman έδειξε ότι τα παράγωγα του τριφαινυλομεθανίου όπως το ιώδες της γεντιανής και οι λαμπρές πράσινες χρωστικές παρουσιάζουν ανασταλτική δράση κυρίως στα θετικά κατά Gram βακτήρια, ενώ το κρυσταλλικό ιώδες προκαλεί αναστολή στην ανάπτυξη κάποιων κατηγοριών μυκήτων (Darzins 1958).
- 1923: Ο Muller περιέγραψε ένα μέσο, στο οποίο πρόσθεσε ιώδιο και θειοθειικό νάτριο τα οποία αντιδρούν μεταξύ τους και παράγεται τετραθειονικό οξύ. Η εκλεκτικότητα του τετραθειονικού οξέος εξαρτάται από το εάν ένας οργανισμός διαθέτει ή όχι το ένζυμο τετραθειονάση. Βακτηριακά είδη των γενών *Salmonella* και *Proteus* φέρουν το ένζυμο, έτσι μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία τετραθειονικού οξέως (Muller 1923).
- Έως τη δεκαετία του 1930, οι βακτηριολόγοι αντιλήφθηκαν πληρέστερα τη σημασία των αυξητικών παραγόντων στη διατροφή των βακτηρίων και τη δεκαετία του 1950 έγιναν περισσότερο κατανοητοί οι μηχανισμοί των συνενζύμων και των βιοχημικών ιδιοτήτων (Krebs 1937). Η χρήση αντιβιοτικών στα θρεπτικά υποστρώματα ως εκλεκτικών παραγόντων, αποτέλεσε ακόμα μια σημαντική εξέλιξη (Wainright 1999). Ο Thayer-Martin το 1964 (Zimbardo and Power 2003), μελέτησε την προσθήκη μίγματος 3 αντιβιοτικών (βανκομυκίνης, κολιστίνης και τριμεθοπρίμης) σε κοινό θρεπτικό υπόστρωμα, για την απομόνωση των *Neisseria gonorrhoeae* και *N. Meningitidis* (Εικόνα 4).



α) Τυπικές αποικίες *N. Gonorrhoea* σε Thayer-Martin agar

β) σε Chocolate agar

Εικόνα 4: Τυπικά θεραπευτικά υποστρώματα με τη χρήση αντιβιοτικών.

Παράλληλα με την ανάπτυξη των εκλεκτικών μέσων, παρήχθησαν και τα διαγνωστικά μέσα στις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Ο κύριος παράγοντας για αυτό, ήταν η διαγνωστική σημασία των αιμολυτικών αντιδράσεων. Το 1919 ο James Brown χρησιμοποίησε το αιματούχο άγαρ για τη μελέτη βακτηρίων του γένους *Streptococcus* καθώς και για τη διαφοροποίηση ειδών *Staphylococcus* ανάλογα με τον τύπο της αιμόλυσης (αιμόλυση τύπου άλφα, βήτα και γάμμα), συμβάλλοντας στη διάγνωση σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων (Thayer and Martin 1964) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Τύποι αιμόλυσης σε αιματούχο άγαρ.

Η ανακάλυψη νέων μικροοργανισμών αποτελεί νέα πρόκληση και απαιτεί νέες μεθόδους απομόνωσης. Η απομόνωση και ταυτοποίηση του βακτηρίου *Legionella*

pneumophila ως αιτιολογικού παράγοντα της νόσου των λεγεωνάριων (Legionnaires) από τους Joseph McDade και Charles C. Shepard το 1977, απαίτησε την ανάπτυξη νέων μέσων, τόσο για την εξέταση κλινικών δειγμάτων αλλά και δειγμάτων νερού (Brown 1919). Άλλες αξιοσημείωτες εξελίξεις περιλαμβάνουν την παραγωγή του R2A Agar για την ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων από δείγματα νερού (Reasoner and Geldrich's R2A agar) (Massa et al 1998). Επιπλέον, το 1983 ο Barry Marshall απέδειξε ότι απομονώσεις από γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά έλκη περιείχαν έναν οργανισμό τύπου *Campylobacter* που αργότερα ονομάστηκε *Helicobacter pylori* (McDade et al 1977). Πιο πρόσφατα, το 2002 βρέθηκε ο πρώτος ανθεκτικός στη βανκομυκίνη *Staphylococcus aureus* (VRSA) στο Μίσιγκαν και την Πενσυλβάνια στις ΗΠΑ, γεγονός που οδήγησε στην ανάπτυξη διαφορετικών θρεπτικών μέσων (Clark et al 2005). Με ένα άλλο πιο πρόσφατα αναγνωρισμένο βακτήριο αναπτύχθηκε ένα ειδικό χρωμογόνο μέσο για την ειδική ανίχνευση του αναδυόμενου παθογόνου *Enterobacter sakazakii* από βρεφικό γάλα (Lehner et al 2005).

Ειδικά μέσα, όπως τα χρωμογόνα μέσα, αντιπροσωπεύουν μια άλλη σχετικά πρόσφατη εξέλιξη. Τα χρωμογόνα είναι μόρια που έχουν σχεδιαστεί για να μιμούνται μεταβολικά υποστρώματα που είναι άχρωμα μέχρι να διασπαστούν από το ένζυμο στόχο. Μόλις διαχωριστεί το μόριο γίνεται τόσο αδιάλυτο όσο και χρωματισμένο, έτσι συσσωρεύεται μέσα στο κελί. Αυτό σημαίνει ότι οι αποικίες ενός οργανισμού που κατέχουν το ένζυμο μπορούν εύκολα να διαφοροποιηθούν από εκείνες που δεν το κάνουν. Με το σχεδιασμό ενός επιλεκτικού μέσου βάσης και την προσθήκη χρωμογόνων υποστρωμάτων μπορούν να σχεδιαστούν, εκλεκτικά ή υπερ-εκλεκτικά υποστρώματα ανάπτυξης, τα οποία επιτρέπουν τη διαφοροποίηση και την ταυτοποίηση ομάδων οργανισμών. Με τα χρωμογόνα θρεπτικά διαφοροποιητικά υλικά, τα οποία περιέχουν ειδικά χρωμογόνα υποστρώματα που όταν έρθουν σε επαφή με τα ένζυμα του μικροβίου ή μύκητα παράγουν χρώμα. Συμβάλλουν έτσι στην προκαταρκτική ταυτοποίηση αυτών.

Ένας μεγάλος αριθμός χρωμογόνων μέσων είναι τώρα διαθέσιμος για οργανισμούς τόσο ευρείας εμβέλειας όπως *E. coli* και *Coliforms*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, παθογόνα ουροποιητικού συστήματος, *Clostridium perfringens* και είδη *Candida* (Manafi 2000). Η κατασκευή θρεπτικών μέσων στον 21^ο αιώνα αποτελεί συνέχεια και εμφανίζει ομοιότητες με τους πρωτοπόρους κατασκευαστές του παρελθόντος. Το κύριο «ενεργό» συστατικό των μέσων καλλιέργειας παραμένει και είναι οι πεπτόνες, οι οποίες υδρολύονται παρουσία οξέων ή ενζύμων (Coutea et al 2001). Σήμερα οι πεπτόνες παράγονται σε μεγάλο ποσοστό από ζωικούς ιστούς (όπως συκώτι, καρδιά), αλλά επίσης

επίσης οι κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και pH μέσα στο περιβάλλον του θρεπτικού υποστρώματος. Τα περισσότερα βακτήρια, αναπτύσσονται στη θερμοκρασία των 36-37°C, δηλαδή στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η χρήση επωαστικού κλιβάνου, ο οποίος λειτουργεί συνεχώς στη συγκεκριμένη θερμοκρασία και μέσα στον οποίο τοποθετούνται τα εμβολιασμένα με το βακτήριο θρεπτικά υποστρώματα. Ο χρόνος που απαιτείται για την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων στις καλλιέργειες, κυμαίνεται από 24-48 h. Χαρακτηριστική εξαίρεση αποτελεί η καλλιέργεια του βακτηριδίου *Mycobacterium tuberculosis*, το οποίο αναπτύσσεται συνήθως μετά από 18-40 ημέρες. Η υγρασία αποτελεί σημαντικό παράγοντα ανάπτυξης για τους περισσότερους μικροοργανισμούς. Η θερμοκρασία του κλιβάνου, η οποία επιδρά στα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος, δημιουργεί την υγρασία που χρειάζονται οι διάφοροι μικροοργανισμοί για την ανάπτυξή τους. Το pH ενός θρεπτικού υποστρώματος, δηλαδή ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου, κυμαίνεται στα περισσότερα θρεπτικά υποστρώματα από 7-7,6. Σε χαμηλότερες ή υψηλότερες τιμές pH, τα περισσότερα βακτήρια δεν μπορούν να αναπτυχθούν και στην περίπτωση αυτή όμως, υπάρχουν εξαιρέσεις, όπως για παράδειγμα το *Vibrio cholerae* (Δονάκιο της χολέρας), το οποίο είναι ένα αλκαλόφιλο βακτήριο και χρειάζεται pH 8,5-9,5 για την ανάπτυξή του. Πρέπει να σημειωθεί, ότι κατά την επώαση ενός υποστρώματος και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, το pH του μπορεί να αυξάνεται ή να ελαττώνεται, ανάλογα με τις βιοχημικές αντιδράσεις που διενεργούνται από τους μικροοργανισμούς. Κατά την παρασκευή και τη συντήρηση του υποστρώματος όμως, το pH θα πρέπει να διατηρείται σταθερό, με τη βοήθεια ρυθμιστικών διαλυμάτων, τα οποία προστίθενται ως συστατικά.

Οι 3 βασικές ιδιότητες που πρέπει να διαθέτει ένα θρεπτικό υπόστρωμα είναι οι εξής:

- A. Να διαθέτει το κατάλληλο pH:** Το pH αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα περισσότερα υποστρώματα, έχουν pH μεταξύ των τιμών 7-7,6. Στο συγκεκριμένο pH, αναπτύσσονται οι περισσότεροι μικροοργανισμοί. Υπάρχουν όμως οξεόφιλα βακτήρια, τα οποία απαιτούν pH 8. Η ρύθμιση του pH γίνεται πάντοτε πριν από την αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος, διότι διαφορετικά υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσής του. Σε περίπτωση που το pH είναι χαμηλότερο από αυτό που απαιτείται από τα βακτήρια, τότε προστίθεται διάλυμα NaOH κανονικότητας N/10 στο θρεπτικό υπόστρωμα, μέχρις ότου αυτό ανέλθει στην επιθυμητή τιμή. Αντίστοιχα, εάν το pH είναι υψηλότερο από το απαιτούμενο, τότε προστίθεται

διάλυμα HCl κανονικότητας N/10, μέχρις ότου αυτό κατέλθει στην επιθυμητή τιμή. Φυσικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα διαλύματα οξέων ή βάσεων, για τη ρύθμιση του pH (Power and Johnson 2009, Rosso et al 1995).

Τα παραπάνω ισχύουν για την παρασκευή ενός θρεπτικού υποστρώματος από τα επιμέρους συστατικά του, μέσα στο μικροβιολογικό εργαστήριο. Σήμερα πλέον, τα θρεπτικά υποστρώματα έχουν τη μορφή σκόνης, στην οποία περιέχονται όλα τα συστατικά τους και το pH είναι ήδη ρυθμισμένο. Το μόνο που χρειάζεται είναι η διάλυση της σκόνης στο νερό, το οποίο πρέπει να είναι συνήθως ζεστό.

B. Να είναι αποστειρωμένο: Η αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της καλλιέργειας. Το υπόστρωμα θα πρέπει να είναι αποστειρωμένο μετά την παρασκευή του, έτσι ώστε να καλλιεργηθεί σ' αυτό μόνο ο υπεύθυνος παθογόνος μικροοργανισμός από ένα κλινικό δείγμα. Σε περίπτωση που το υπόστρωμα δεν είναι αποστειρωμένο, αλλά έχει επιμολυνθεί κατά την παρασκευή του από βακτήρια του περιβάλλοντος, τότε κατά τη διάρκεια της επώασης, τα βακτήρια που θα αναπτυχθούν σ' αυτό θα προέρχονται και από το περιβάλλον και από το κλινικό δείγμα που εμβολιάστηκε. Ως εκ τούτου, το αποτέλεσμα της καλλιέργειας θα είναι ψευδές, με κίνδυνο να δοθεί λάθος αντιβιοτικό στον ασθενή. Κατά την παρασκευή ενός θρεπτικού υποστρώματος, θα πρέπει να λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα αποστείρωσης, ούτως ώστε ο κίνδυνος επιμόλυνσης από βακτήρια του περιβάλλοντος, να εκμηδενισθεί. Για το λόγο αυτό, όλα τα σκεύη και εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του, όπως ογκομετρικοί κύλινδροι, κωνικές φιάλες κτλ., θα πρέπει να είναι ήδη αποστειρωμένα πριν από τη χρήση τους. Μετά την παρασκευή του υποστρώματος, ακολουθεί η αποστείρωσή του στο αυτόκαυστο. Επειδή τα θρεπτικά υποστρώματα αποτελούνται από ευπαθή χημικά συστατικά, ο κατάλληλος τρόπος αποστείρωσής τους είναι με τη βοήθεια ατμού υπό πίεση. Αμέσως μετά την παρασκευή τους, τοποθετούνται στο αυτόκαυστο, οπότε αποστειρώνονται στους 121°C για 20-30 min, σε πίεση 1 atm.

Πολλά θρεπτικά υποστρώματα περιέχουν υδατάνθρακες, οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στη θερμότητα, όπως είναι η γλυκόζη, η λακτόζη και η σουκρόζη. Αυτά τα υποστρώματα μπορούν να αποστειρωθούν στο αυτόκαυστο. Πρέπει να ληφθεί υπόψη όμως, ότι οι πολλαπλές αποστειρώσεις μπορούν να ελαττώσουν τη συγκέντρωση του υδατάνθρακα στο υπόστρωμα, να μεταβάλουν το χρώμα του και να αλλάξουν το pH του, που σημαίνει ότι το υλικό αυτό είναι πλέον ακατάλληλο

για καλλιέργεια. Άρα, η αποστείρωση στο αυτόκαυστο θα πρέπει να γίνεται μόνο μία φορά. Σε περίπτωση που δεν γίνει σωστή αποστείρωση, θα πρέπει το υπόστρωμα να παρασκευασθεί ξανά και το παλιό να απορριφθεί.

Υπάρχουν υδατάνθρακες, οι οποίοι είναι ευπαθείς στη θερμοκρασία του αυτοκαύστου, όπως για παράδειγμα η ξυλόζη. Στην περίπτωση αυτή, αντί για το αυτόκαυστο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας άλλος τρόπος αποστείρωσης, όπως η διήθηση. Κατά τη διήθηση, το διάλυμα που πρόκειται να αποστειρωθεί, διέρχεται μέσα από ειδικό φίλτρο που διαθέτει πόρους, οι οποίοι έχουν αρκετά μικρό μέγεθος ώστε να συγκρατούν τα βακτήρια στην επιφάνεια του φίλτρου και ταυτόχρονα τέτοιο μέγεθος, ώστε να επιτρέπουν στα μόρια του διαλύματος να διέλθουν από τους πόρους αυτούς. Η διήθηση χρησιμοποιείται επίσης και για την αποστείρωση άλλων ευπαθών διαλυμάτων, όπως ο ορός αίματος, το ασκитικό υγρό, διαλύματα αντιβιοτικών κτλ.

Η διήθηση, ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων που συγκρατούν οι ηθμοί, χωρίζεται σε 3 κατηγορίες: **α)** απλή διήθηση, όταν τα σωματίδια που συγκρατούνται έχουν διάμετρο $>10 \mu\text{m}$, **β)** μικροδιήθηση, όταν τα σωματίδια που συγκρατούνται έχουν διάμετρο μεταξύ $0,02 \mu\text{m}$ και $10 \mu\text{m}$, **γ)** υπερδιήθηση, όταν τα σωματίδια που συγκρατούνται, έχουν διάμετρο $<0,02\mu\text{m}$. Για την αποστείρωση υλικών που περιέχουν βακτήρια, το μέγεθος των πόρων πρέπει να είναι $0,2 \mu\text{m}$. Για την αποστείρωση υλικών που περιέχουν ιούς και μυκοπλάσματα, το μέγεθος των πόρων πρέπει να κυμαίνεται από $0,01 \mu\text{m}$ – $0,1 \mu\text{m}$. Οι ηθμοί με τη σειρά τους, ταξινομούνται σε 2 κατηγορίες: **α)** Ηθμοί με μεμβράνες, οι οποίες διαθέτουν πόρους που συγκρατούν τα αντίστοιχα σωματίδια στην επιφάνειά τους. **β)** Ηθμοί βάθους, οι οποίοι διαθέτουν σπογγώδη δομή. Η δομή αυτή επιτρέπει τη διόδο των σωματιδίων μέσα στον ηθμό, ως ένα σημείο, χωρίς όμως να μπορούν να τον διαπεράσουν. Οι γνωστότεροι ηθμοί που κυκλοφορούν σήμερα, είναι οι ηθμοί Whatman. Η αποστείρωση είναι επιτυχής, όταν ο ηθμός μπορεί να συγκρατήσει το 100% των βακτηριδίων *Pseudomonas diminuta* (10^7 βακτηρίδια/cm² επιφάνειας ηθμού), τα οποία πιέζονται επάνω σ' αυτόν, με πίεση 30 psi.

Έλεγχος αποστείρωσης: Μετά την αποστείρωση ενός θρεπτικού υποστρώματος, είτε με το αυτόκαυστο, είτε με διήθηση, θα πρέπει να γίνει ο έλεγχος της αποστείρωσης, δηλαδή να εξακριβωθεί κατά πόσο αυτή ήταν επιτυχημένη. Για το σκοπό αυτό, το υπόστρωμα αμέσως μετά την αποστείρωσή του, διαμοιράζεται είτε σε σωληνάρια, είτε σε τρυβλία Petri, τα οποία τοποθετούνται στον επωαστικό

κλίβανο, στους 37 °C για 24 h. Την επόμενη ημέρα, γίνεται έλεγχος των υποστρωμάτων. Σε περίπτωση που δεν έχουν αναπτυχθεί μικροοργανισμοί, το υλικό είναι αποστειρωμένο και έτοιμο για χρήση. Η καλλιέργεια μπορεί να ξεκινήσει άμεσα, με εμβολιασμό του παθολογικού υλικού ή αργότερα, οπότε το υπόστρωμα τοποθετείται στο ψυγείο στους 4 °C, έως ότου χρησιμοποιηθεί. Σε περίπτωση όμως που έχουν αναπτυχθεί βακτήρια στο υπόστρωμα, τότε η αποστείρωση ήταν ελλιπής. Έτσι, θα πρέπει να παρασκευασθεί νέο θρεπτικό υπόστρωμα και το παλιό να απορριφθεί, ως ακατάλληλο για καλλιέργεια.

Δύο επιπλέον τρόποι ελέγχου της αποστείρωσης των θρεπτικών υποστρωμάτων είναι οι παρακάτω: **α)** η χρήση βιολογικών δεικτών: αποτελούν την πιο αξιόπιστη μέθοδο ελέγχου της αποστείρωσης. Χρησιμοποιούνται σπόροι μη παθογόνων βακτηριδίων, τα οποία είναι όμως πολύ ανθεκτικά στις διάφορες μεθόδους αποστείρωσης. Για τον ξηρό κλίβανο, χρησιμοποιούνται οι σπόροι του βακτηριδίου *Bacillus subtilis* var. *niger*, για το αυτόκαυστο, οι σπόροι του βακτηριδίου *Bacillus stearothermophilus* και για τον κλίβανο οξειδίου του αιθυλενίου, οι σπόροι του βακτηριδίου *Bacillus subtilis* var. *globigii*. Οι σπόροι βρίσκονται σε ειδικό φιαλίδιο, το οποίο περιέχει θρεπτικό ζυμό, γλυκόζη και μία χρωστική ουσία που αλλάζει χρώμα, όταν αυτοί αναπτύσσονται. Το φιαλίδιο τοποθετείται μαζί με τα προς αποστείρωση υλικά, μέσα στον αντίστοιχο κλίβανο. Μετά την αποστείρωση, διενεργείται επώαση του φιαλιδίου που περιέχει τους σπόρους, στους 60 °C για 24-48 h. Σε περίπτωση που το χρώμα του υλικού παραμείνει το ίδιο, σημαίνει ότι η αποστείρωση ήταν επιτυχής, αφού δεν έχουν αναπτυχθεί οι σπόροι. Σε περίπτωση που το χρώμα του υλικού αλλάξει, σημαίνει ότι η αποστείρωση ήταν ανεπιτυχής, αφού οι σπόροι κατάφεραν να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν τα αντίστοιχα βακτηρίδια. Ένα δείγμα του υλικού μπορεί επίσης να αποσταλεί σε ειδικά κέντρα, στα οποία γίνεται καλλιέργεια και εξαγωγή αποτελεσμάτων. Ο έλεγχος με βιολογικούς δείκτες, πρέπει να διενεργείται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα για τον κάθε κλίβανο. **β)** Χημικοί δείκτες: κυκλοφορούν με τη μορφή ταινιών, οι οποίες φέρουν ειδικές χημικές ουσίες στην επιφάνειά τους. Οι ουσίες αυτές έχουν την ικανότητα να αλλάζουν χρώμα, με τις μεταβολές της πίεσης, της θερμοκρασίας, του χρόνου, ξεχωριστά ή σε συνδυασμό. Έτσι, οι ταινίες τοποθετούνται μέσα στον κλίβανο και αποτελούν δείκτες επιτυχούς ή ανεπιτυχούς αποστείρωσης, ανάλογα με το χρώμα που θα αποκτήσουν μετά την

αποστείρωση. Χρησιμοποιούνται κυρίως στο αυτόκαυστο και στους κλιβάνους οξειδίου του αιθυλενίου.

Γ. Να περιέχει τα κατάλληλα θρεπτικά συστατικά:

Τα βακτήρια προκειμένου να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν έχουν ανάγκη από θρεπτικά συστατικά όπως νερό, πηγές άνθρακα και αζώτου και ορισμένα μεταλλικά άλατα (Kumar 2012).

1.5 Βασικά συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων

Ένα θρεπτικό υλικό για να ικανοποιεί τις απαιτήσεις των μικροοργανισμών για ανάπτυξη, πρέπει να περιέχει ποσότητες άνθρακα, αζώτου, ανόργανων αλάτων, ιχνοστοιχείων, νερού και βιταμινών. Τα βασικά συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων είναι: νερό, άγαρ, πεπτόνες, εκχύλισμα κρέατος, εκχύλισμα μυκήτων, σάκχαρα, εκλεκτικές ουσίες ή εκλεκτικά μίγματα, χρωματομετρικοί δείκτες, αναγωγικές ουσίες, αίμα (προβάτου, αλόγου, κουνελιού) και βιολογικά υγρά.

Νερό: Το νερό παίζει θεμελιώδη ρόλο στη διαλυτοποίηση των θρεπτικών συστατικών, τη μεταφορά τους και την εξασφάλιση των αντιδράσεων υδρόλυσης. Κάποια βακτήρια απαιτούν ελεύθερο νερό για την ανάπτυξή τους. Εάν υπάρξει εξάτμιση κατά την επώαση του άγαρ, μπορεί να υπάρξει απώλεια αυτού του νερού, με αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους της αποικίας και την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης (Power and Johnson 2009).

Η ποιότητα του νερού είναι σημαντικός παράγοντας για την παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων. Χρησιμοποιείται: αποστειρωμένο και απεσταγμένο (αφαίρεση των στερεών ουσιών - βακτήρια, ιούς, βαρέα μέταλλα και ανόργανες ουσίες.) ή απιονισμένο (χωρίς ιόντα Na, Cl). Το νερό βρύσης δεν χρησιμοποιείται λόγω της περιεκτικότητάς του σε χημικές προσμίξεις, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη των μικροβίων.

Άγαρ: Είναι φυτική ουσία και προέρχεται από τα ερυθρά θαλάσσια φύκη (ροδοφύκη), κυρίως από τα είδη *Gelidium*, *Gracilaria* και *Pterocladia*. Όσον αφορά τη χημική του σύσταση, αποτελείται από πολυσακχαρίτες στερεά ενωμένους με άλατα ασβεστίου. Δεν διασπάται από τα ένζυμα των μικροβίων και δεν περιέχει θρεπτικές ουσίες για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Ο ρόλος του άγαρ είναι η πήξη του υλικού και χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1- 2%. Όταν το άγαρ στερεοποιηθεί, παραμένει στερεό σε υψηλές θερμοκρασίες μέχρι 85 °C, οπότε υγροποιείται ξανά. Η ιδιότητά του αυτή ονομάζεται υστέρηση (hysteresis). Στερεοποιείται στους 32-40 °C. Αυτές οι ιδιότητές του

αποτελούν πλεονέκτημα για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών, γιατί παραμένει στερεό στους 37-42 °C σε σχέση με άλλα υλικά (π.χ. ζελατίνη).

Πεπτόνες: Είναι βιομηχανικά προϊόντα προερχόμενα από κρέας, άλευρο και σόγια. Αποτελούν την κύρια πηγή αζώτου για τα υπό καλλιέργεια βακτηριακά κύτταρα. Είναι μίγματα πολυπεπτιδίων, ολιγοπεπτιδίων, αμινοξέων, υδατανθράκων, βιταμινών, σακχάρων, λιπαρών οξέων, ανόργανων αλάτων (φωσφόρου, μαγνησίου, καλίου) και αυξητικών παραγόντων (ριβοφλαβίνη, νικοτινικό οξύ). Παράγονται από την πρωτεόλυση ή υδρόλυση φυσικών προϊόντων, πλούσιων σε πρωτεΐνες όπως το κρέας (meat peptones), το γάλα (casein peptones) και λαχανικών όπως η σόγια (soy peptones), με τη βοήθεια οξέων, αλάτων, ή ειδικών πρωτεολυτικών παραγόντων (όπως η πεψίνη, η καζεΐνη και η θρυψίνη). Ανάλογα με τη πηγή προέλευσης και τη μέθοδο υδρόλυσής τους έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά.

Η τρυπτόνη έχει αυξημένη περιεκτικότητα σε τρυπτοφάνη και χαμηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Χρησιμεύει στη μελέτη βιοχημικών δοκιμών (ινδόλη, οξειδάση).

Η τρυπτόζη περιέχει εκχύλισμα κρέατος αλλά δεν περιέχει υδατάνθρακες.

Η πρωτεόζη παράγεται από το γάλα ή από το κρέας και περιέχει σε μεγάλο βαθμό υδατάνθρακες.

Εκχύλισμα κρέατος: Παρασκευάζεται από άπαχο κρέας ή άλλους ιστούς μετά από βρασμό σε νερό. Ως αποτέλεσμα του βρασμού εκχυλίζονται διάφορες υδατοδιαλυτές ουσίες όπως προϊόντα αποδόμησης πρωτεϊνών, άλατα και αυξητικοί παράγοντες. Στη συνέχεια απομακρύνεται το λίπος και το λεύκωμα με διήθηση, συμπυκνώνονται σε χαμηλή πίεση και διατίθενται στο εμπόριο με τη μορφή σκόνης ή πολτού, σε φιαλίδια ή σωληνάκια.

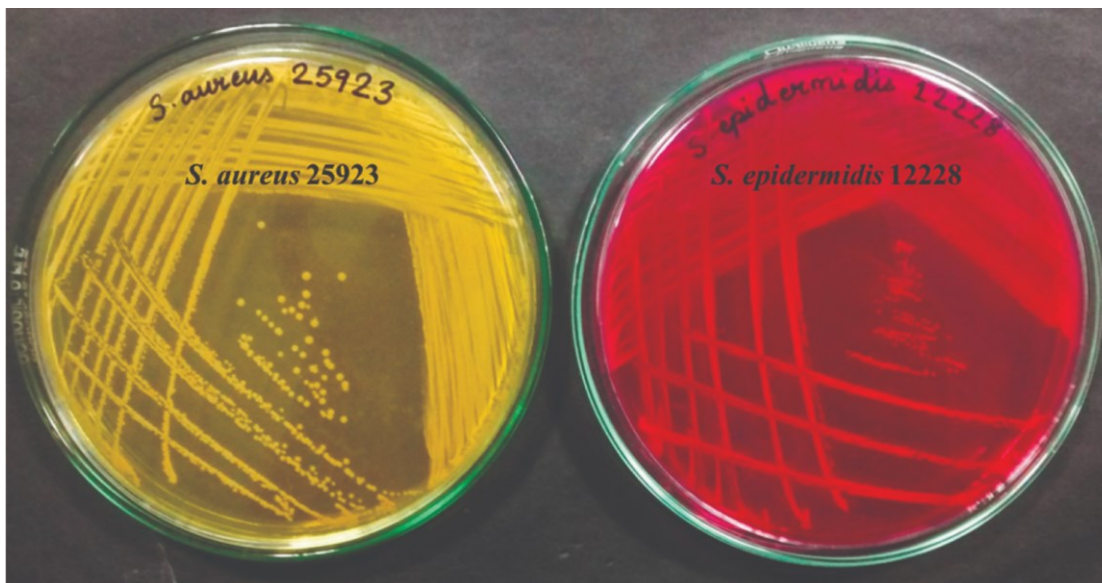
Εκχύλισμα μυκήτων: Είναι προϊόν ανάλογο με το εκχύλισμα κρέατος και παράγεται από την υδρόλυση της ζυθοζύμης από καλλιέργειες ζυμομυκήτων, πλούσιο σε βιταμίνες και αμινοξέα.

Σάκχαρα: Είναι αζωτούχες (κρεατίνη, κρεατινίνη, αμινοξέα) και μη αζωτούχες ουσίες (γλυκόζη, μαλτόζη), οι οποίες προστίθενται στα θρεπτικά υλικά για την **α)** ανάπτυξη των μικροοργανισμών (κύρια πηγή άνθρακα και ενέργειας) και **β)** για τη μελέτη διαφόρων βιοχημικών ιδιοτήτων. Χωρίζονται σε: μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, σουκρόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη), δισακχαρίτες (ραφινόζη, λακτόζη), πολυσακχαρίτες (άμυλο, γλυκογόνο, ινουλίνη, δεξτράνες), γλυκοζίδια (σαλικίνη, εσκουλίνη), αλκοόλες (γλυκερόλη, μαννιτόλη, σορβιτόλη) και πεντόζες (αραβινόζη, ξυλόζη και ραμνόζη).

Εκλεκτικές ουσίες: Αποτελούν τη βάση των εκλεκτικών και ειδικών θρεπτικών υποστρωμάτων προσδίδοντάς τους χαρακτηριστικές ιδιότητες και προστίθενται υπό στείρες συνθήκες σε κάποια φάση παρασκευής του θρεπτικού υποστρώματος. Εκλεκτικές ουσίες μπορεί να είναι χρωστικές, άλατα, αντιβιοτικά κ.α. Πολλές χρωστικές έχουν μικροβιοστατικές ιδιότητες. Τα άλατα ρυθμίζουν την πυκνότητα των ιόντων υδρογόνου (pH) και την ωσμωτική πίεση, ενώ αναστέλλουν την ανάπτυξη ορισμένων μικροβίων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν: η προσθήκη NaCl στο Charman, άλας το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη του *S. aureus*, τα χολικά άλατα ευνοούν την ανάπτυξη των εντεροκόκκων και τα άλατα του σεληνίτη ευνοούν την ανάπτυξη των σαλμονελών και τις σιγκελλών.

Αντιβιοτικά: Έχουν την ιδιότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, ενώ ο ζητούμενος μικροοργανισμός είναι ανθεκτικός και αναπτύσσεται. Τέτοιες ουσίες είναι: η χλωραμφαινικόλη, η τριμεθοπρίμη, η νεομυκίνη, η βανκομυκίνη, η καναμυκίνη, το ναλιδιξικό οξύ κ.α. Προστίθενται στα θρεπτικά υλικά, τα οποία χρησιμοποιούνται για την απομόνωση: αναεροβίων, καμπυλοβακτηριδίου, αιμόφιλου, ναϊσσεριών.

Χρωματομετρικοί δείκτες: Είναι ουσίες οι οποίες συνήθως χρησιμοποιούνται για την αποκάλυψη των μεταβολών του pH του διαλύματος στο οποίο περιέχονται. Είναι ουσίες που προσδίδουν χρώμα στο υπόστρωμα και έχουν την ιδιότητα να αλλάζουν το χρώμα του, ανάλογα με το pH που δημιουργείται κατά την ανάπτυξη ενός βακτηρίου. Έτσι λοιπόν, μετά την ανάπτυξη ενός βακτηρίου, το υπόστρωμα, μπορεί να έχει διαφορετικό χρώμα από το αρχικό. Η αλλαγή του pH οφείλεται κυρίως στη διάσπαση των υδατανθράκων ή των αμινοξέων του υποστρώματος από τα βακτήρια που αναπτύσσονται σ' αυτό. Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται συχνότερα στα θρεπτικά υποστρώματα, είναι το ερυθρό της φαινόλης, το ουδέτερο ερυθρό, το κυανό της βρωμοθυμόλης, το πορφυρό της βρωμοκρεσόλης και το πράσινο του μεθυλίου. Το Phenol red χρησιμοποιείται περισσότερο διότι αλλάζει χρώμα σε τιμές pH που απαιτούν τα πλέον κοινά μικροβιακά είδη, ενώ οι δείκτες Methylene blue και Rezazurin είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι δείκτες για τον έλεγχο ζυμώνσεων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αλατούχο άγαρ μαννιτόλης του Charman, το οποίο χρησιμοποιείται στη διαφοροποίηση των σταφυλοκόκκων. Συγκεκριμένα ο *S. aureus* ζυμώνει τη μαννιτόλη και παράγεται οξύ, το οποίο ανιχνεύεται με τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης από την αλλαγή χρώματος από κόκκινο (pH 8,4) σε κίτρινο (pH 6,8), ενώ οι αποικίες των υπολοίπων σταφυλοκόκκων παραμένουν λευκές (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Αποικίες πρότυπων στελεχών *S. aureus* και *S. epidermidis* σε Mannitol Salt Agar.

Τα χρωμογόνα και τα φθοριογόνα είναι ουσίες οι οποίες προστίθενται στα θρεπτικά υλικά και συμβάλουν στη διαφοροποίηση και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, γιατί λύονται από συγκεκριμένα ένζυμα και απελευθερώνουν διαφορετικές χρωματιστές ή φθορίζουσες ουσίες.

Αυξητικοί παράγοντες

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι στοιχεία, τα οποία τα βακτήρια αδυνατούν να συνθέσουν από τα θρεπτικά συστατικά που διατίθενται στο περιβάλλον τους (Knaysi et al 1951, Kumar 2012), απαιτούνται σε μικρές ποσότητες στο μέσο καλλιέργειας και η ανάγκη παρουσίας τους στο θρεπτικό υλικό δικαιολογείται από την απουσία ή τον αποκλεισμό μεταβολικής οδού του βακτηριακού κυττάρου.

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αυξητικών παραγόντων μεταξύ των οποίων:

Βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης: είναι απαραίτητες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια απαιτούν αδείνη, γουανίνη, θυμίνη ή ουρακίλη προκειμένου να αναπτυχθούν (Knaysi et al 1951). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το βακτήριο *Leuconostoc mesenteroides*, για το οποίο η γουανίνη είναι απαραίτητη στην ανάπτυξή της (Snell and Mitchell 1941).

Αμινοξέα: είναι επίσης αυξητικοί παράγοντες και χρησιμοποιούνται στη σύνθεση πρωτεϊνών. Οι Dunn et al. έδειξαν το 1947 ότι μόνο δύο αμινοξέα απαιτούνται για την ανάπτυξη του *Leuconostoc mesenteroides*, το γλουταμικό οξύ και τη βαλίνη, ενώ για

το γένος *Lactobacillus brevis*, απαιτούνται τουλάχιστον 15 αμινοξέα (Power and Johnson 2009).

Βιταμίνες: Οι βιταμίνες είναι συνένζυμα ή πρόδρομοι συνενζύμων. Είναι οργανικές ουσίες, απαραίτητες σε μικρές ποσότητες για τον μεταβολισμό ενός ζωντανού οργανισμού, ο οποίος δεν μπορεί να τις συνθέσει σε επαρκή ποσότητα από μόνος του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα βακτηρίου, το οποίο απαιτεί μεγάλο αριθμό βιταμινών προκειμένου να αναπτυχθεί είναι το *Faecalibacterium prausnitzii*, το οποίο απαιτεί βιταμίνες όπως η βιοτίνη, το φολικό οξύ, η ριβοφλαβίνη και η B12 (Duncan et al 2002).

Αίμα και παράγωγα αυτού: Το αίμα και τα παράγωγά του ενισχύσουν επίσης την ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων. Συνήθως στα μέσα καλλιέργειας προστίθεται αίμα προβάτου ή αλόγου σε αναλογία 5%. Ο ρόλος του αίματος είναι η προστατευτική του δράση έναντι των τοξικών ριζών οξυγόνου (Collins 1967), καθώς επίσης χρησιμοποιείται συμπληρωματικά στη διατροφή των βακτηρίων. Για παράδειγμα, το αίμα προβάτου παρέχει τον παράγοντα X (haem) απαραίτητο για την ανάπτυξη πολλών παθογόνων βακτηριακών ειδών, συμπεριλαμβανομένου του *Haemophilus influenzae*. Επίσης ορός αίματος εμβρύων μοσχαριών ή αμνών, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως αυξητικός παράγοντας παρέχοντας μεγάλο αριθμό συστατικών όπως λιπίδια, βιταμίνες, τριγλυκερίδια, μέταλλα και άλλα (Cézard 2013).

Ασκιτικό υγρό: Είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη ορισμένων βακτηριακών ειδών μιμούμενο το φυσικό τους περιβάλλον (Lagier 2012).

Αντιοξειδωτικά: Ορισμένα αναερόβια βακτήρια απαιτούν νέες στρατηγικές καλλιέργειας για την απομόνωσή τους. Αναερόβια βακτήρια βρίσκονται σε μεγάλους πληθυσμούς στα ανθρώπινα εντερικά μικροβιώματα και είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στο οξυγόνο, το οποίο είναι τοξικό για αυτά. Ως εκ τούτου, η προσθήκη αντιοξειδωτικών στα μέσα καλλιέργειας επιτρέπουν την καλλιέργεια αυστηρά αναερόβιων βακτηρίων υπό αερόβιες συνθήκες (Lagier et al 2015, La Scola et al 2014). Ορισμένα αντιοξειδωτικά έχουν δοκιμαστεί και έχουν δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Αυτό ισχύει για το ασκορβικό οξύ και τη γλουταθειόνη ή το ουρικό οξύ. Η προσθήκη αυτών των αντιοξειδωτικών στο μέσο καλλιέργειας και η επώασή του υπό αερόβιες συνθήκες επέτρεψε την ανάπτυξη 135 αυστηρών αναερόβιων βακτηρίων, 12 μικροαεροφιλικών βακτηρίων και 22 αυστηρών αερόβιων βακτηρίων (Dione et al 2016).

1.6 Κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων

Τα θρεπτικά υποστρώματα (culture media) ως τεχνητά μίγματα ουσιών, τα οποία χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια των μικροβίων *in vitro*, περιέχουν θρεπτικές ουσίες και παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων (τα οποία ενδεχομένως να υπάρχουν στο δείγμα), δίνοντας έτσι τη δυνατότητα να γίνει απομόνωση, ταυτοποίηση και αντιβιογράμμα των παθογόνων μικροβίων.

Τα θρεπτικά υποστρώματα, ανάλογα με τη φυσική τους κατάσταση χωρίζονται σε 3 κατηγορίες (Corry et al 1996):

1.6.1. Υγρά

Υγρά θρεπτικά υποστρώματα τα οποία δεν περιέχουν άγαρ. Στα υποστρώματα αυτά δεν είναι δυνατός ο διαχωρισμός των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σ' αυτά δημιουργώντας θολερότητα του διαλύματος, το οποίο πριν από τον εμβολιασμό είναι διαυγές. Στα υποστρώματα αυτά μπορούν να μελετηθούν διάφοροι βιολογικοί και βιοχημικοί χαρακτήρες των βακτηρίων, όπως η κίνηση, η παραγωγή ινδόλης, η διάσπαση υδατανθράκων κτλ. Οι παραπάνω δοκιμασίες καθίστανται εμφανείς, συνήθως με την αλλαγή του αρχικού χρώματος του υποστρώματος. Στα υγρά υποστρώματα, καλλιεργούνται παθολογικά υλικά, τα οποία δεν καλλιεργούνται εύκολα στα στερεά υποστρώματα, όπως αίμα και ιστοί. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα υγρά υποστρώματα είναι εμφανής με τη θόλωσή τους, αμέσως μετά την επώαση ή με την αλλαγή του χρώματός τους, προσθέτοντας ειδικά αντιδραστήρια μετά την επώαση.

Τα υγρά υποστρώματα, διαχωρίζονται σε 3 κατηγορίες:

- 1) Φυσικά (αίμα, ορός αίματος, ασκιτικό υγρό, γάλα)
- 2) Ζωικά (ζωμός κρέατος, πεπτονούχο νερό),
- 3) Φυτικά (εκχυλίσματα και αφεψήματα φυτών). Τα υλικά αυτά, τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες μετά την αποστείρωσή τους (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Υγρά θρεπτικά υποστρώματα σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

1.6.2. Στερεά

Τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα περιέχουν άγαρ σε αναλογία 1,5-2 g. Χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των μικροοργανισμών, με σκοπό την ταυτοποίησή τους μέσω βιοχημικών και ορολογικών δοκιμών. Στα υποστρώματα αυτά, οι μικροοργανισμοί σχηματίζουν αποικίες, οι οποίες είναι ορατές με γυμνό μάτι. Κάθε αποικία προέρχεται από ένα και μόνο μικροοργανισμό και περιέχει εκατομμύρια μικροοργανισμούς. Η μορφολογία των αποικιών των διαφόρων μικροοργανισμών ποικίλλει, με αποτέλεσμα καθένας τους, να δημιουργεί αποικίες χαρακτηριστικής μορφής στα στερεά υποστρώματα. Οι αποικίες των μικροοργανισμών διακρίνονται από το μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα τους. Το σχήμα τους είναι συνήθως κυκλικό, ενώ μπορεί να έχουν και ανώμαλα σχήματα, ιδίως όταν καλλιεργούνται μύκητες. Το μέγεθός τους ποικίλλει από ελάχιστα ορατό με το γυμνό μάτι (μέγεθος κεφαλής καρφίτσας), έως αρκετά μεγάλο, που καλύπτει τη μεγαλύτερη επιφάνεια του υποστρώματος (αποικίες μυκήτων). Οι αποικίες, μπορεί να είναι επίπεδες, υπερυψωμένες, κυρτές ή να εμφανίζουν θηλές. Ορισμένα βακτήρια δημιουργούν αποικίες, από τις οποίες αναδύεται χαρακτηριστική οσμή (π.χ. *Pseudomonas aeruginosa* – γασεμί, *Proteus mirabilis* – καμμένη σοκολάτα, *Streptococcus milleri* – καραμέλα, *Eikenella corrodens* – χλωρίνη). Ο αριθμός των αποικιών χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε υγρά παθολογικά υλικά (Colony forming units – cfu/mL υγρού). Τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα τοποθετούνται σε τρυβλία Petri ή σε δοκιμαστικούς σωλήνες (Εικόνα 9).

1.6.3. Ημίρρευστα

Τα ημίρρευστα θρεπτικά υποστρώματα αποτελούν ενδιάμεση κατηγορία μεταξύ των υγρών και των στερεών υποστρωμάτων. Περιέχουν άγαρ σε ποσότητα μικρότερη από 1%.

(υλικά ελέγχου κινητικότητας). Χρησιμοποιούνται κυρίως ως υλικά συντήρησης των μικροοργανισμών, όταν απαιτείται να μεταφερθούν σε μεγάλη απόσταση έως ότου καλλιεργηθούν (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Κατηγορίες θρεπτικών υποστρωμάτων ανάλογα με τη φυσική τους κατάσταση.

Τα θρεπτικά υποστρώματα, ανάλογα με τη σύνθεση και τη χρησιμότητά τους, μπορεί να ταξινομηθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

- **Φυσικά ή εμπειρικά ζωϊκής ή φυτικής προέλευσης**

Τα υποστρώματα αυτά λαμβάνονται κατά κανόνα από τη φύση (π.χ. γάλα, αίμα, πατάτα, εκχυλίσματα φρούτων). Περιέχουν ποικιλία θρεπτικών στοιχείων χωρίς όμως να είναι γνωστή η ακριβής σύσταση αυτών.

- **Συνθετικά ή χημικώς καθορισμένα θρεπτικά υλικά**

Η χημική τους σύσταση είναι γνωστή τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Παρασκευάζονται στο εργαστήριο ή στη βιομηχανία σύμφωνα με οδηγίες, οι οποίες αναφέρουν τη σύστασή τους καθώς και τις οδηγίες παρασκευής τους.

Χωρίζονται σε:

1. Κοινά ή βασικά (μη εκλεκτικά) θρεπτικά υλικά

Περιέχουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη μεγάλης ποικιλίας διαφόρων τύπων μικροοργανισμών, οι οποίοι δεν έχουν αυξημένες μεταβολικές ανάγκες. Χρησιμοποιούνται για την άμεση καλλιέργεια των κλινικών δειγμάτων και ως βάση για την παρασκευή των ειδικών θρεπτικών υποστρωμάτων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα βασικών θρεπτικών υλικών αποτελούν ο θρεπτικός ζωμός και το θρεπτικό άγαρ.

2. Εμπλουτιστικά

Είναι τα υλικά τα οποία είναι εμπλουτισμένα με ένα ή περισσότερα πρόσθετα όπως αίμα, βιταμίνες, αμινοξέα, λευκώματα, σάκχαρα και προάγουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηρίων. Παράδειγμα αποτελεί το αιματούχο άγαρ, στο οποίο προστίθεται αίμα σε θρεπτικό άγαρ και έτσι, προάγεται η ανάπτυξη των Gram (+) κόκκων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν επίσης ζωμοί που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών από δείγματα που περιέχουν πολλά είδη μικροοργανισμών.

Πολλές φορές περιέχουν και εκλεκτικές ουσίες, που καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των άλλων μικροοργανισμών. Έτσι ο ζητούμενος μικροοργανισμός αυξάνει και σε απόλυτο αριθμό και σχετικά με τους άλλους μικροοργανισμούς. Παραδείγματα εμπλουτιστικών θρεπτικών υλικών αποτελούν: **α)** ο ζωμός σεληνιώδους νατρίου ο οποίος χρησιμοποιείται για την απομόνωση των σαλμονελών στα κόπρανα. **β)** ο θειογλυκολικός ζωμός χωρίς δείκτη. **γ)** ο ζωμός streptoseI, ο οποίος χρησιμοποιείται για την απομόνωση των β-αιμολυτικών στρεπτόκοκκων.

3. Εκλεκτικά ή ανασταλτικά θρεπτικά υλικά

Είναι συνήθως στερεά, επιτρέπουν την ανάπτυξη ορισμένων και επιβραδύνουν ή αναστέλλουν τελείως την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Παρασκευάζονται με την προσθήκη κατάλληλων εκλεκτικών ουσιών οι οποίες μπορεί να είναι χρωστικές, άλατα (μετάλλων ή χολικά άλατα), αντιβιοτικά. Τα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά τα οποία πρόκειται να χρησιμοποιηθούν επιλέγονται ανάλογα με τον μικροοργανισμό ή την ομάδα των μικροοργανισμών που αναζητούνται (οι ανασταλτικές ιδιότητες των εκλεκτικών ουσιών είναι ειδικές). Τα εκλεκτικά υλικά πρέπει να είναι αρκετά ευαίσθητα, ώστε να ανιχνεύσουν την παρουσία ακόμη και πολύ μικρού αριθμού μικροοργανισμών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εκλεκτικού θρεπτικού υλικού είναι το Bile Aesculin Agar, το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη των εντεροκόκκων ενώ αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων κόκκων.

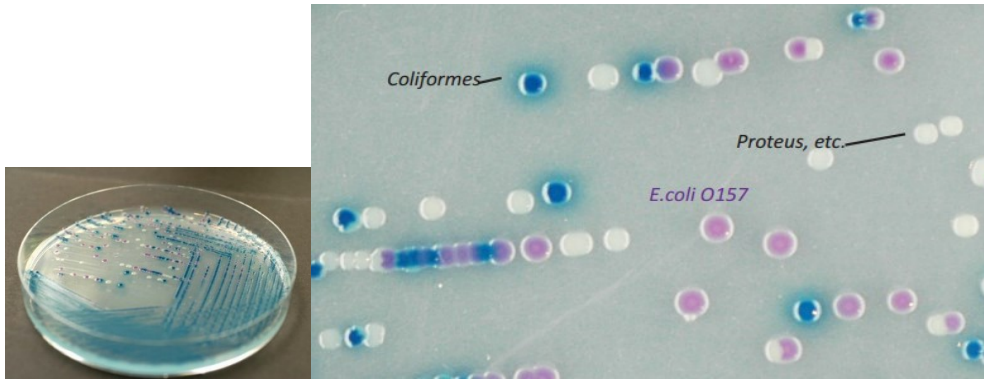
4. Διαφοροποιητικά θρεπτικά υλικά

Είναι τα υλικά που επιτρέπουν την αναγνώριση μιας ιδιότητας του μικροοργανισμού, με ορατή αλλαγή στο υλικό ή στο καλλιέργημα. Συνήθως περιέχουν ένα βασικό υπόστρωμα, υδατάνθρακες και ένα δείκτη (δείχνει τη χρησιμοποίηση ή όχι του υποστρώματος), ουσίες οι οποίες συνήθως εμπεριέχονται στο ίδιο υλικό. Το Mc Conkey Agar περιέχει χολικά άλατα, δείκτη Phenol red και λακτόζη και έτσι διαφοροποιούνται οι λακτόζη (+) από τους λακτόζη (-) μικροοργανισμούς.

Στην κατηγορία των διαφοροποιητικών θρεπτικών υλικών ανήκουν τα χρωμογόνα θρεπτικά υλικά, τα οποία είναι νέας γενιάς υλικά. Περιέχουν ειδικές χρωμογόνες ουσίες, οι οποίες όταν έρθουν σε επαφή με τα ένζυμα του μικροβίου ή μύκητα παράγουν χρώμα. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα χρωμογόνων θρεπτικών υλικών παρουσιάζονται στον πίνακα 1 και στις εικόνες 10 - 11.

Πίνακας 1: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα χρωμογόνων θρεπτικών υλικών, που χρησιμοποιούνται ευρέως στην μικροβιολογία τροφίμων.

Χρωμογόνο θρεπτικό υλικό	Χρήση
CHROMAGAR E. COLI O157	Απομόνωση και ταυτοποίηση του εντεροπαθογόνου κολοβακτηριδίου O157.
CHROMAGAR E.COLI	Ανίχνευση και αριθμητικό υπολογισμό της <i>E. Coli</i> .
CHROMAGAR ECC	Ανίχνευση και ταυτοποίηση της <i>E.coli - coliforms</i> (ECC) και τον υπολογισμό όλων των εντεροβακτηριακών από τρόφιμα και δείγματα νερού.
CHROMAGAR ESBL	Ανίχνευση των Gram (-) βακτηριδίων με ESBL αντίσταση (παραγωγή ESBL βλακταμασών).
CHROMAGAR LISTERIA	Απομόνωση και ταυτοποίηση της <i>Listeria monocytogenes</i> από τα άλλα στελέχη <i>Listeria</i> ή βακτήρια.
CHROMAGAR STAPH. AUREUS	Απομόνωση και την απευθείας διαφοροποίηση του <i>Staphylococcus aureus</i> από το χρώμα της αποικίας. Διαθέτει μεγάλη ευαισθησία στην ανίχνευση του <i>S. aureus</i> μετά από 24 h επώασης με το χρώμα των αποικιών του να είναι πάντα έντονο ροζ.
CHROMAGAR MRSA	Διαφοροποίηση του παθογόνου <i>staphylococcus aureus</i> του ανθεκτικού στη Methicillin συμπεριλαμβανομένου και του χαμηλού επιπέδου MRSA.
CHROMAGAR SALMONELLA PLUS	Εκλεκτικός διαχωρισμός των ειδών <i>Salmonella spp</i> συμπεριλαμβανομένων των <i>S. typhi</i> , <i>S. paratyphi</i> και των λακτόζη (+) από άλλα gram (-) βακτήρια.
CHROMAGAR STREP B	Διαφοροποίηση και απομόνωση του παθογόνου <i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS) από άλλους στρεπτόκοκκους.



Εικόνα 10: Οι τυπικές αποικίες *E. coli* O157 στο CHROMagar™ O157 εμφανίζονται με μωβ χρώμα.



Εικόνα 11: Οι τυπικές αποικίες *Listeria monocytogenes* στο CHROMagar εμφανίζονται μπλέ, έχουν διάμετρο μικρότερη από 3mm, φέρουν λευκή άλω, ενώ οι αποικίες άλλων μικροοργανισμών εμφανίζονται μπλέ, άχρωμες, διάφορα άλλα χρώματα ή αναστέλλεται η ανάπτυξή τους.

5. Υλικά συντήρησης βακτηριακών στελεχών

Τα υποστρώματα αυτής της κατηγορίας δεν ευνοούν πολύ την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και χρησιμοποιούνται για την διατήρηση μικροβιακών στελεχών και των χαρακτηριστικών τους για όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα όπως παραδείγματος χάριν το Skimmed milk.

6. Υλικά μεταφοράς δειγμάτων

Χρησιμοποιούνται για την τοποθέτηση και βραχυχρόνια διατήρηση των δειγμάτων μέχρι την μεταφορά τους. Η διατήρηση γίνεται σε συνθήκες τέτοιες που να μην επηρεάζονται πολύ ο αριθμός και η ζωτικότητα των μικροοργανισμών. Υλικά μεταφοράς δειγμάτων είναι το υλικό Amies (για αναερόβια) και το υλικό Stuart. Φέρονται στο εμπόριο σε σωληνάρια και σε μικρά βιδωτά μπουκαλάκια.

Άλλα ειδικά θρεπτικά υλικά

Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται ορισμένα θρεπτικά υλικά με ειδικά υποστρώματα. Χρησιμοποιούνται για την απομόνωση συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Χαρακτηριστικά ειδικά θρεπτικά υλικά είναι το Lowenstein για την απομόνωση των μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης και περιέχει αυγά. Το υλικό Loeffler για την απομόνωση του κορυνοβακτηριδίου διφθερίτιδας και περιέχει ορό βοός.

• Ζωντανά μέσα

Ένας τρίτος τύπος καλλιεργητικών μέσων είναι τα «ζωντανά» μέσα. Τα Ζωντανά μέσα καλλιέργειας αποτελούνται από ομάδες ζωντανών κυττάρων όπως ιστούς, ή κάλους ή όργανο που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη ιών και ρικετσιών. Τα έμβρυα κοτόπουλου χρησιμοποιούνται συνήθως για την καλλιέργεια ιών. Ζύμες, μύκητες και βακτήρια, εάν εισέλθουν ως μολυσματικοί παράγοντες, είναι σε θέση να πολλαπλασιαστούν στα υγρά των εμβρύων κοτόπουλου όπως σε έναν σωλήνα καλλιέργειας.

1.7 Τεχνικές προδιαγραφές των θρεπτικών υποστρωμάτων

Τα θρεπτικά υποστρώματα, παρέχονται από τις φαρμακευτικές εταιρείες και φέρονται μέσα σε ειδικά πλαστικά δοχεία, υπό μορφή σκόνης. Σήμερα, πολλές φαρμακευτικές εταιρείες παρασκευάζουν τα θρεπτικά υποστρώματα, τα οποία διανέμουν έτοιμα στα μικροβιολογικά εργαστήρια, είτε μέσα σε τρυβλία Petri, είτε μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οπότε χρειάζονται μόνο συντήρηση στο ψυγείο.

Και στις 2 περιπτώσεις, πρέπει να πληρούνται ορισμένες προδιαγραφές, έτσι ώστε τα υποστρώματα να είναι κατάλληλα για την καλλιέργεια των διαφόρων μικροοργανισμών.

Αυτές είναι:

- Η εταιρία παραγωγής θα πρέπει να είναι πιστοποιημένη σύμφωνα με το πρότυπο ISO 9001:2000.

- Τα υποστρώματα που περιέχουν συστατικά κρέατος, θα πρέπει να συνοδεύονται κατά την παράδοσή τους από πιστοποιητικό απαλλαγής από την νόσο της σπογγιόμορφης εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών (Bovine Spongiform Encephalopathy – BSE) ή ότι οι πρώτες ύλες τους προέρχονται από χώρες απαλλαγμένες από την νόσο BSE.
- Τα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα θα πρέπει να συνοδεύονται από πιστοποιητικό ποιοτικού ελέγχου, στο οποίο να περιλαμβάνονται τα φυσικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Επίσης, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται η επίδοση του υποστρώματος, με τουλάχιστον 2 θετικά και 2 αρνητικά στελέχη μικροοργανισμών, κατά προτίμηση σε μεικτές καλλιέργειες (θετικών και αρνητικών μαρτύρων), καθώς και σε μονοκαλλιέργεια, εκτός εάν αναφέρεται κάτι διαφορετικό στις παρατηρήσεις της προδιαγραφής του υλικού.
- Τα έτοιμα προς χρήση υποστρώματα θα πρέπει να είναι σύμφωνα με τις προδιαγραφές που περιλαμβάνονται στα πρότυπα ISO / TS 11133-1 και 11133-2.

1.8 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Η παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων είναι μία διαδικασία, η οποία απαιτεί μεγάλη προσοχή σε κάθε βήμα της, έτσι ώστε το υπόστρωμα που θα δημιουργηθεί να είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών.

Τα σκεύη και τα υλικά που χρειάζονται είναι:

- Κωνική φιάλη ή ποτήρι ζέσεως
- Γυάλινος αναδευτήρας
- Η σκόνη του θρεπτικού υποστρώματος ή τα επιμέρους συστατικά του
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- Απεσταγμένο νερό
- Θερμαντική πηγή
- Δοκιμαστικοί σωλήνες ή τρυβλία Petri
- Επωαστικός κλίβανος
- Αυτόκαυστο ή φίλτρα διήθησης

Όλα τα γυάλινα σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή του υποστρώματος, πρέπει να είναι αποστειρωμένα, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Το νερό που θα χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για τη σκόνη ή για τα διάφορα συστατικά του υποστρώματος, θα πρέπει να είναι πάντοτε απεσταγμένο και αποστειρωμένο. Απεσταγμένο είναι το νερό, από το οποίο έχουν αφαιρεθεί τα διάφορα θετικά και αρνητικά ιόντα, που θα μπορούσαν

να επηρεάσουν την τελική σύσταση του διαλύματος. Πριν από την παρασκευή του υποστρώματος, θα πρέπει να γίνει προσεκτική ανάγνωση των οδηγιών που αναγράφονται στη συσκευασία του. Εκεί αναφέρονται, εκτός των άλλων και οι κατάλληλες αναλογίες της σκόνης που πρέπει να διαλυθεί μέσα στο απεσταγμένο νερό. Ανάλογα με τον όγκο του διαλύματος που χρειάζεται να παρασκευασθεί, ζυγίζεται και η αντίστοιχη ποσότητα σκόνης ή επιμέρους συστατικών, με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού ζυγού (Lech and Brent 2000).

Αρχικά, τοποθετείται ο κατάλληλος όγκος απεσταγμένου νερού μέσα στο σκεύος παρασκευής (κωνική φιάλη ή ποτήρι ζέσεως), με τη βοήθεια του ογκομετρικού κυλίνδρου. Στη συνέχεια, ζυγίζονται με ακρίβεια τα διάφορα συστατικά του θεραπευτικού υποστρώματος και τοποθετούνται μέσα στο δοχείο παρασκευής. Ακολουθεί η θέρμανση του διαλύματος, από θερμαντική πηγή και η συνεχής ανάδυσή του, έτσι ώστε η σκόνη να διαλυθεί πολύ καλά μέσα στο νερό, χωρίς να υπάρχουν καθιζήματα ή κόκκοι που να επιπλέουν. Η θέρμανση διαρκεί μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές ή να αρχίσει να βράζει, οπότε απομακρύνεται από τη θερμαντική πηγή και αφήνεται να κρυώσει, εκτός εάν αναφέρεται κάτι διαφορετικό στις οδηγίες παρασκευής.

Εάν το θεραπευτικό υπόστρωμα είναι υγρό, τοποθετείται μετά από λίγη ώρα στους δοκιμαστικούς σωλήνες, μέχρι το 1/3 ή το 1/2 του όγκου τους. Στη συνέχεια, οι σωλήνες πωματίζονται με ανυδρόφιλο βαμβάκι και τοποθετούνται στο αυτόκαυστο για αποστείρωση. Μετά την αποστείρωση, οι σωλήνες μπορούν να τοποθετηθούν στο ψυγείο για λίγες ημέρες, έτσι ώστε να συντηρηθούν, έως ότου εμβολιασθούν με παθολογικό υλικό.

Εάν το θεραπευτικό υπόστρωμα είναι στερεό, δηλαδή περιέχει άγαρ, η διαδικασία είναι διαφορετική. Καθώς η σκόνη διαλύεται στο ζεστό νερό στη θερμοκρασία των 100 °C, το άγαρ λιώνει. Όταν η θερμοκρασία του υποστρώματος κατέλθει στους 40-45 °C, το άγαρ στερεοποιείται, οπότε το υλικό παίρνει τη μορφή πηκτής. Για το λόγο αυτό, μετά την απομάκρυνση του δοχείου από τη θερμαντική πηγή, το υπόστρωμα θα πρέπει να τοποθετηθεί στους δοκιμαστικούς σωλήνες ή στα τρυβλία Petri, όταν η θερμοκρασία του κατέλθει γύρω στους 50 °C, ώστε αυτό να μην προλάβει να πήξει μέσα στο δοχείο παρασκευής. Η θερμοκρασία αυτή μετράται πρακτικά, τοποθετώντας το δοχείο παρασκευής στην παλάμη, οπότε εάν η θερμότητα είναι καλά ανεκτή από το χέρι, η θερμοκρασία βρίσκεται γύρω στους 50 °C. Υπάρχουν βέβαια διαφορές από άτομο σε άτομο, όσον αφορά την αίσθηση της θερμοκρασίας. Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί θερμόμετρο για τη μέτρηση της θερμοκρασίας του υποστρώματος, διότι θα επιμολύνει το

διάλυμα. Επίσης, το στερεό υπόστρωμα δεν πρέπει να τοποθετείται αμέσως μετά την απομάκρυνσή του από τη θερμαντική πηγή στο τρυβλίο Petri, διότι αυτό αποτελείται από λεπτό πλαστικό υλικό, το οποίο μπορεί να λιώσει από τη μεγάλη θερμοκρασία του διαλύματος.

Σε περίπτωση που το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα τοποθετηθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες, το στόμιό τους καλύπτεται με ανυδρόφιλο βαμβάκι και αυτοί τοποθετούνται στο αυτόκαυστο για αποστείρωση. Μετά την αποστείρωση, το υλικό είναι υγρό, λόγω της μεγάλης θερμοκρασίας. Οι σωλήνες θα πρέπει να τοποθετηθούν σε κεκλιμένη θέση, έτσι ώστε μετά την πήξη του υλικού (λόγω της καθόδου της θερμοκρασίας), να δημιουργηθεί μεγάλη διαγώνια επιφάνεια για τον εμβολιασμό του παθολογικού υλικού. Μετά την πήξη του υποστρώματος, οι σωλήνες μπορούν να τοποθετηθούν στο ψυγείο, μέσα σε ειδικά καλάθια ή σε στατώ, ώστε να συντηρηθούν μέχρι τον εμβολιασμό τους. Εάν το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα τοποθετηθεί σε τρυβλία Petri, αυτό θα πρέπει γίνει μετά την αποστείρωση στο αυτόκαυστο, όταν η θερμοκρασία του δοχείου παρασκευής κατέλθει γύρω στους 50 °C. Χρειάζεται προσοχή, διότι, εάν η θερμοκρασία κατέλθει περισσότερο, το άγαρ που περιέχεται στο δοχείο θα πήξει και το υλικό δεν θα είναι δυνατό να τοποθετηθεί στα τρυβλία. Το υπόστρωμα θα πρέπει να γεμίσει περίπου το 1/3-1/2 του όγκου του τρυβλίου και όχι περισσότερο. Αφότου τοποθετηθεί το υπόστρωμα, το οποίο είναι ακόμη αρκετά ζεστό, το τρυβλίο αφήνεται με το καπάκι μισάνοιχτο, έτσι ώστε να μη δημιουργούνται αρκετοί υδρατμοί, οι οποίοι πέφτοντας στην επιφάνειά του, μπορεί να αλλοιώσουν τη σύστασή του. Αφού το υλικό κρυώσει, τα τρυβλία κλείνονται και τοποθετούνται με το καπάκι προς τα κάτω, μέσα στο ψυγείο, έως ότου χρειασθεί να εμβολιασθούν (Entis 2002, Fischbach and Dunning 2009).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΝΝΟΙΑ ΤΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Οποιαδήποτε χρωματισμένη οργανική ένωση, που συνήθως ονομάζεται βαφή, χρησιμοποιείται για τη χρώση ιστών, κυττάρων, συστατικών κυττάρων, περιεχομένων κυττάρων ή μικροοργανισμών. Οι χρωστικές είναι ένα σημαντικό εργαλείο για τους βιολογικούς ερευνητές, ιδιαίτερα για τους επιστήμονες.

Οι χρωστικές έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών από τα τέλη του 1800 (Popescu and Doyle, 1996). Η χρώση δε κατά Gram παραμένει η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη, επειδή ανιχνεύει και διαφοροποιεί ένα ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών. Η επόμενη πιο συχνά χρησιμοποιούμενη διαγνωστική τεχνική είναι η χρώση γρήγορου οξινισμού (acid-fast), που χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση του *Mycobacterium tuberculosis* και άλλων σοβαρών λοιμώξεων. Πολλοί μολυσματικοί παράγοντες αναπτύσσονται αργά σε καλλιεργητικά μέσα ή μπορεί να παραμένουν στάσιμοι, χωρίς τάσεις πολλαπλασιασμού. Σε αυτές τις περιπτώσεις η χρήση των χρωστικών μπορεί να είναι η μόνη μέθοδος ανίχνευση αυτών των μικροοργανισμών σε κλινικά δείγματα. Στα χέρια έμπειρων κλινικών ερευνητών, η μελέτη των χρώσεων σε δείγματα παρέχουν γρήγορες και οικονομικά αποδοτικές πληροφορίες για την προκαταρκτική διάγνωση μολυσματικών ασθενειών (Madison 2001, Sandle 2004, Sandle 2020).

Η χρώση ή χρωστική μπορεί να είναι φυσική ή συνθετική. Το χρωματισμένο αντικείμενο ονομάζεται υπόστρωμα. Το μικρό μέγεθος και η διαπερατότητα των μικροοργανισμών και των κυττάρων τους, καθιστούν δύσκολη την ταυτοποίηση ακόμη και με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου υψηλής ισχύος. Η χρώση διευκολύνει την παρατήρηση ενός υποστρώματος δημιουργώντας μεταβλητότητα στην οπτική πυκνότητα ή στην απορρόφηση φωτός μεταξύ του υποστρώματος και του περιβάλλοντος ή μεταξύ διαφορετικών τμημάτων του ίδιου υποστρώματος. Στην ηλεκτρονική μικροσκοπία, και μερικές φορές σε μικροσκοπία φωτός, η χρώση επιτυγχάνεται με την εναπόθεση υπερφωτοσκοπικών μορίων ενός μετάλλου, όπως χρώμιο ή χρυσό (η αποκαλούμενη διαδικασία σκίασης), στο υπόστρωμα ή η χρώση γίνεται με κατεργασία του υποστρώματος με διαλύματα μεταλλικών ενώσεων, όπως οξεικό ουρανυλεστέρα ή φωσφοβολφραμικό οξύ (Μαργαρίτης και Ζαράνη 2001).

2.2 Τεχνικές χρώσης

Επειδή το μικροβιακό κυτταρόπλασμα είναι συνήθως διαφανές, είναι απαραίτητο να χρωματίζονται οι μικροοργανισμοί προτού παρατηρηθούν με το μικροσκόπιο φωτός. Σε μερικές περιπτώσεις, η χρώση είναι περιττή, για παράδειγμα όταν οι μικροοργανισμοί είναι πολύ μεγάλοι ή όταν πρέπει να μελετηθεί η κινητικότητα, μια σταγόνα των μικροοργανισμών μπορεί να τοποθετηθεί απευθείας πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα και να παρατηρηθεί. Ένα τέτοιο παρασκεύασμα ονομάζεται υγρή βάση. Μια υγρή βάση μπορεί επίσης να παρασκευαστεί τοποθετώντας μια σταγόνα καλλιέργειας σε μία καλυπτρίδα και στη συνέχεια αναστρέφοντάς την πάνω από μια αντικειμενοφόρο πλάκα.

Κατά τη διαδικασία της χρώσης, ένας μικρός αριθμός αποικιών του μικροοργανισμού τοποθετείται σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα. Το επίχρισμα επικολλάται με θερμότητα, περνώντας την αντικειμενοφόρο πλάκα γρήγορα πάνω από φλόγα. Η θερμική μονιμοποίηση σκοτώνει τους οργανισμούς, τους κάνει να προσκολλώνται στην αντικειμενοφόρο πλάκα και επιτρέπει να δέχονται τη χρώση.

2.3 Απλές τεχνικές χρώσης

Η χρώση μπορεί να πραγματοποιηθεί με βασικές βαφές – χρωστικές, όπως κρυσταλλικό ιώδες ή μπλε του μεθυλενίου, θετικά φορτισμένες χρωστικές που έλκονται από τα αρνητικά φορτισμένα υλικά του μικροβιακού κυτταροπλάσματος. Μια τέτοια διαδικασία είναι η απλή διαδικασία χρώσης. Μια εναλλακτική εφαρμογή χρώσης είναι η χρήση χρωστικής ουσίας όπως η νιγροσίνη ή το κόκκινο του Κονγκό, οι οποίες είναι όξινες, αρνητικά φορτισμένες χρώσεις. Έτσι, αυτές, απομακρύνονται από το αρνητικά φορτισμένο κυτταρόπλασμα και συγκεντρώνονται γύρω από τα κύτταρα, αφήνοντας τα κύτταρα καθαρά και μη χρωματισμένα. Αυτή η τεχνική ονομάζεται τεχνική αρνητικής χρώσης.

Διαφορικές τεχνικές χρώσης: Η τεχνική διαφορικής χρώσης διακρίνει δύο είδη οργανισμών.

Ένα παράδειγμα είναι η τεχνική χρώσης κατά Gram. Η χρώση κατά Gram παραμένει η θεμελιώδης μέθοδος καθοριστικής βακτηριολογίας, διαίρεσης βακτηρίων σε Gram-θετικούς και Gram-αρνητικούς οργανισμούς. Αυτή η δοκιμή παρέχει πληροφορίες ως προς την προέλευση κάθε μόλυνσης και αποτελεί προϋπόθεση για πολλές μεθόδους ανίχνευσης μικροβιακών πληθυσμών (Sandle 2020).

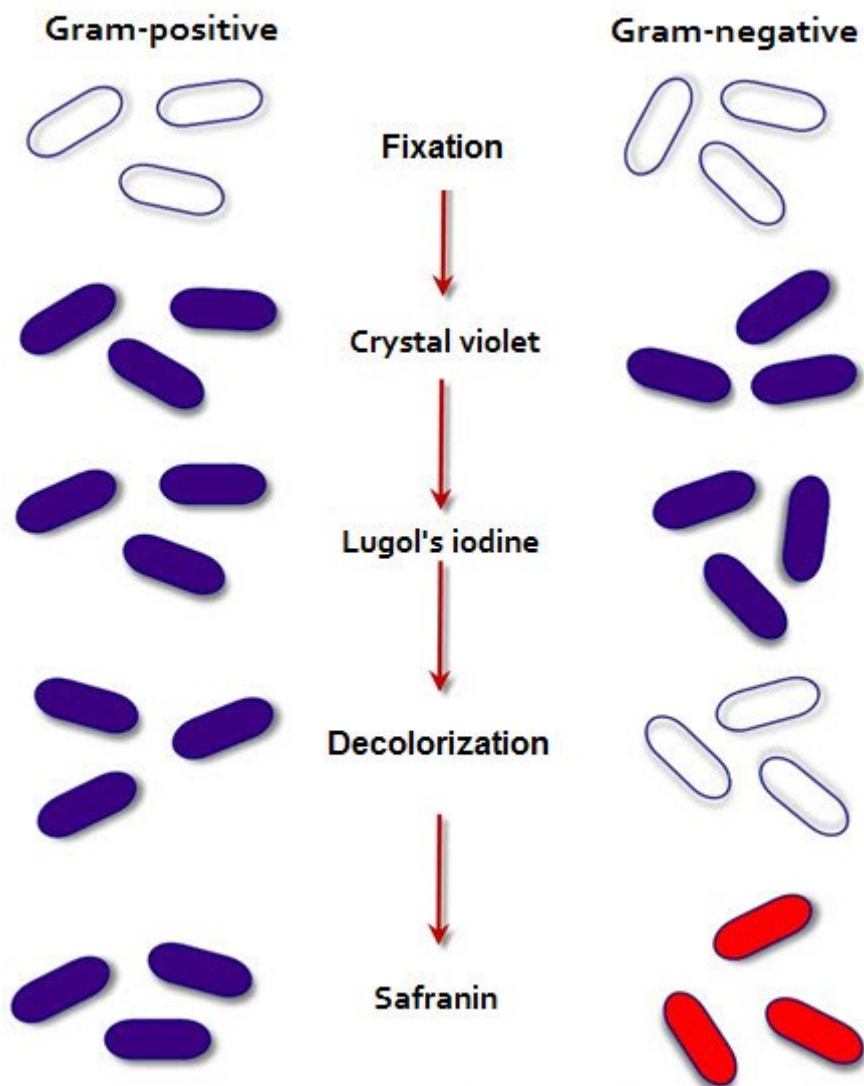
Αυτή η διαφορική τεχνική, όπως προαναφέρθηκε, διαχωρίζει τα βακτήρια σε δύο ομάδες, Gram-θετικά βακτήρια και Gram-αρνητικά βακτηρίδια. Αρχικά εφαρμόζεται το κρυσταλλικό ιώδες, ακολουθούμενο από την χρωστική της ιωδίνης, η οποία μονιμοποιεί τη χρώση. Στη συνέχεια, η αντικειμενοφόρος πλάκα, ξεπλένεται με αλκοόλη και τα Gram-θετικά βακτήρια διατηρούν το κρυσταλλικό ιώδες χρώμα του ιωδίου. Ωστόσο, τα Gram-αρνητικά βακτήρια χάνουν τη χρώση. Τα Gram-αρνητικά βακτηρίδια στη συνέχεια χρωματίζονται με τη βαφή σαφρανίνης, που παίζει το ρόλο της αντίθετης χρώσης, που χρησιμοποιείται ως δεύτερη χρωστική στην συγκεκριμένη μέθοδο. Αυτά τα βακτήρια εμφανίζονται κόκκινα κάτω από το διηθητικό φακό 100x , ενώ τα Gram-θετικά βακτήρια εμφανίζονται μπλε ή μοβ, αντανακλώντας το κρυσταλλικό ιώδες που διατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του σταδίου πλύσης (Διάγραμμα 1).

Μία άλλη τεχνική διαφορικής χρώσης είναι η τεχνική του γρήγορου οξινισμού (acid-fast). Αυτή η τεχνική διαφοροποιεί τα είδη *Mycobacterium* από άλλα βακτήρια. Θερμότητα ή ένας διαλύτης λιπιδίων χρησιμοποιείται για να μεταφέρει την πρώτη χρώση, τη βασική φουξίνη, στα κύτταρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται με αραιό διάλυμα όξινης αλκοόλης. Τα είδη *Mycobacterium* αντιστέκονται στην επίδραση της όξινης αλκοόλης και διατηρούν τη χρώση της βασικής φουξίνης (έντονο κόκκινο). Τα άλλα βακτήρια χάνουν τη χρώση και χρωματίζονται από την επακόλουθη χρωστική κυανού μεθυλενίου (μπλε).

Η πορτοκαλί χρώση ακριδίνης είναι επίσης μία άλλη τεχνική διαφορικής χρώσης. Το πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης είναι μια φθορισμοχρωματική χρωστική που δεσμεύεται σε νουκλεϊκά οξέα των βακτηριδίων και άλλων κυττάρων. Στο υπεριώδες φως, το πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης χρωματίζει το RNA και το μονόκλωνο DNA πορτοκαλί. Το δίκλωνο DNA εμφανίζεται πράσινο. Όταν ρυθμίζεται σε pH 3,5 - 4,0, το πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης χρωματίζει διαφορετικά τους μικροοργανισμούς από τα κυτταρικά υλικά. Τα βακτηρίδια και οι μύκητες χρωματίζονται ομοιόμορφα με έντονο πορτοκαλί, ενώ τα ανθρώπινα επιθηλιακά και φλεγμονώδη κύτταρα, καθώς και τα υπολείμματα του υποβάθρου χρωματίζονται με ανοικτό πράσινο έως κίτρινο. Οι πυρήνες των ενεργοποιημένων λευκοκυττάρων χρωματίζονται με κίτρινο, πορτοκαλί ή κόκκινο λόγω αυξημένης παραγωγής RNA που οφείλεται στην ενεργοποίησή τους. Τα ερυθροκύτταρα είτε δεν χρωματίζονται είτε εμφανίζονται με ανοικτό πράσινο χρώμα. Λόγω αυτής της ιδιότητας διαφορικής χρώσης, επιχρίσματα χρωματισμένα με πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης, τα οποία παρασκευάστηκαν από κλινικά υλικά, είναι δυνατό να εξεταστούν ταχέως με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού σε μεγέθυνση 100x ή

400X ως προς την παρουσία μικροοργανισμών που φθορίζουν με έντονο πορτοκαλί χρώμα, έναντι ενός μαύρου ή ανοικτού πράσινου έως κίτρινου υποβάθρου (Lauer et al 1981, Madison 2001). Άλλες τεχνικές χρώσης επιδιώκουν να αναγνωρίσουν διάφορες σημαντικές βακτηριακές δομές. Για παράδειγμα, μια ειδική τεχνική χρώσεων απομονώνει τις μαστίγες των βακτηριδίων με την επικάλυψη του μαστιγίου με εξειδικευμένες χρώσεις ή μέταλλα για να αυξηθεί το πλάτος τους. Έτσι μπορεί να παρατηρηθούν τα μαστίγια που έχουν χρωματιστεί με αυτόν τον τρόπο.

Μια ειδική τεχνική χρώσης χρησιμοποιείται για να εξετάσει βακτηριακά σπόρια. Το πράσινο του μαλαχίτη χρησιμοποιείται με τη θερμότητα για να επιτρέψει στη χρωστική να εισχωρήσει στα κύτταρα χρωματίζοντας τα αναλόγως. Μία χρώση αντίθετης φάσης, η σαφρανίνη, στη συνέχεια χρησιμοποιείται για να δώσει χρώμα στα βακτηρίδια που δεν εμφανίζουν βακτηριακά σπόρια. Στο τέλος της διαδικασίας, τα σπόρια χρωματίζονται πράσινα και τα άλλα κύτταρα χρωματίζονται κόκκινα.



Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας χρώσης βακτηρίων

Διάγραμμα 1: Η διαδικασία χρώσης Gram που χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση των βακτηρίων σε δύο μεγάλες βασικές ομάδες.

(<http://www.microbiology.biology.upatras.gr/el/component/content/article.html?id=72:-gram>)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

3.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Ερευνητής και πρώην πρόεδρος της Αμερικανικής Εταιρείας Μικροβιολογίας όρισε την «μικροβιολογία» ως μια τεχνητή υποεπιστήμη της βιολογίας, με αντικείμενο μελέτης το «μέγεθος». Αυτό υποδηλώνει ότι οι βασικές βιολογικές αρχές ισχύουν, και συχνά ανακαλύπτονται, στον τομέα της μικροβιολογίας (Montville et al 2012). Η «μικροβιολογία τροφίμων» είναι μια περαιτέρω υποδιαίρεση της μικροβιολογίας. Μελετά τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στα τρόφιμα και πώς οι χημικές ενώσεις που αποτελούν τον κύριο κορμό της δομής των τροφίμων επηρεάζουν τους εν λόγω μικροοργανισμούς. Ωστόσο, η μικροβιολογία των τροφίμων έχει αλλάξει ριζικά τα τελευταία 20 χρόνια. Ο αριθμός των αναγνωρισμένων τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών έχει διπλασιαστεί. Η ασφάλεια των τελικών προϊόντων τροφίμων στηρίζεται πλέον στην μεθοδολογία ασφαλιστικών δικλείδων «ασφάλεια από το αρχικό σχεδιασμό έως το τελικό προϊόν» που παρέχεται από το Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP).

Τρόφιμα ως οικοσυστήματα

Τα τρόφιμα είναι οικοσυστήματα που αποτελούνται από το περιβάλλον και τους μικροοργανισμούς που ζουν σε αυτό. Το περιβάλλον των τροφίμων είναι το σύνολο το χημικών ενώσεων που περικλείονται στη δομή τους και αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους (food matrix) και αποτελείται από εγγενείς παράγοντες όπως, pH, ενεργότητα νερού [a_w] και θρεπτικά συστατικά και εξωγενείς παράγοντες, όπως θερμοκρασία, αέριο περιβάλλον και παρουσία, ως επιμόλυνση, άλλων μικροοργανισμών. Οι εγγενείς και εξωγενείς παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συντήρηση τροφίμων. Όταν εφαρμόζεται στη μικροβιολογία, η οικολογία μπορεί να οριστεί ως η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των χημικών, φυσικών και κατασκευαστικών πτυχών μιας δομής και τη σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού που φιλοξενείται σε αυτή (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1980). Ο όρος «αλληλεπιδράσεις» δίνει έμφαση στη δυναμική πολυπλοκότητα των οικοσυστημάτων τροφίμων.

Το κάθε τρόφιμο ως ένα ενιαίο και σύνθετο οικοσύστημα παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια σε επίπεδο φιλοξενίας και «συντήρησης» διαφόρων μικροοργανισμών εντός των δομικών του στοιχείων. Η δε μικροβιακή αύξηση μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους ενδογενείς (εσωτερικούς) και εξωγενείς (εξωτερικούς) παράγοντες. Η αξιολόγηση αυτών των παραγόντων είναι απαραίτητη ώστε να εκτιμηθούν οι παράγοντες

εκείνοι που πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν για τη συντήρηση ενός τροφίμου και εν γένει της διασφάλισης της παραγωγής ασφαλών τροφίμων. Οι ενδογενείς παράγοντες, περιλαμβάνουν φυσικοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, η δε ετερογένεια αυτών, που αποτελούν το περιβάλλον ενός τροφίμου (τιμές pH, ενεργού οξυγόνου, σύνολο θρεπτικών ουσιών, κ.λπ.) αποτελεί βασικό παράγοντα που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη όταν μελετάται η οικολογία ενός τροφίμου. Τα τρόφιμα ενδέχεται να περιέχουν πολλά επιμέρους μικροπεριβάλλοντα.

Ασφάλεια τροφίμων

Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί μείζονα στόχο της μικροβιολογίας τροφίμων και ένας από τους στόχους της Δημόσιας Υγείας είναι η υγιεινή και ασφαλής διατροφή. Τα τρόφιμα, φυτικής και ζωικής παραγωγής, από την παραγωγή τους μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή, μπορούν να υποστούν αλλοιώσεις, ρυπάνσεις, επιμολύνσεις και άλλες φυσικοχημικές μεταβολές σε σημείο που να απωλέσουν την θρεπτική τους αξία, καθώς και τις φυσιολογικές οργανοληπτικές τους ιδιότητες, ενώ μπορούν ακόμα να προκαλέσουν βλάβη στην υγεία του καταναλωτή.

Η ασφάλεια των τροφίμων είναι ένα σημαντικό ζήτημα που επηρεάζει όλους τους κατοίκους του πλανήτη γη. Πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο αλληλοεξαρτώνται όλο και περισσότερο από τη διαθεσιμότητα του εφοδιασμού τους σε τρόφιμα και την ασφάλειά αυτών. Ως εκ τούτου, οι άνθρωποι σε όλο τον κόσμο εκτιμούν όλο και περισσότερο την διασφάλιση της υγιεινής των τροφίμων (Radovanovic 2011, Uyttendaele et al 2016).

Τα μη ασφαλή τρόφιμα που περιέχουν επιβλαβείς μικροοργανισμούς, ιούς, παράσιτα ή χημικές ουσίες προκαλούν περισσότερες από 200 ασθένειες στον άνθρωπο, από διάρροια έως καρκίνο. Υπολογίζεται ότι 600 εκατομμύρια στον κόσμο νοσούν από τροφιμογενείς λοιμώξεις και 420.000 πεθαίνουν κάθε χρόνο, με αποτέλεσμα την απώλεια 33.000.000 ετών DALYs (disability adjusted life years). Τα παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών φέρουν το 40% της επιβάρυνσης των τροφιμογενών λοιμώξεων, με 125.000 θανάτους κάθε χρόνο. Οι λοιμώξεις διαρροϊκών συνδρόμων είναι οι πιο συχνές ασθένειες που προκύπτουν από την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, με αποτέλεσμα 550 εκατομμύρια άνθρωποι να αρρωσταίνουν και 230.000 να πεθαίνουν κάθε χρόνο (WHO 2019).

3.2 Μικροβιολογία νωπού γάλακτος

Δεδομένου ότι η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώνεται στο νωπό γάλα, είναι σκόπιμο να προχωρήσουμε στην λεπτομερή περιγραφή του γάλακτος και στη μικροβιολογία του.

3.2.1 Γενικά για το γάλα

Το γάλα είναι το χαρακτηριστικό βιολογικό έκκριμα του μαστικού αδένου των θηλαστικών και προορίζεται, από τη φύση, να αποτελέσει τη μοναδική τροφή των νεογνών τους, στα πρώτα στάδια της ζωής τους. Δεδομένου ότι περισσότερα από 4.000 είδη θηλαστικών παράγουν γάλα με χημική σύσταση προσαρμοσμένη στις διατροφικές ανάγκες του νεογνού τους, θεωρείται ότι αποτελεί μία πλήρη τροφή ικανή να διασφαλίσει τη φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού κατά τα πρώτα στάδια της ζωής του και μέχρι τον απογαλακτισμό (το χρονικό διάστημα της γαλουχίας μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το είδος). Περιέχει χημικές ενώσεις που εφοδιάζουν τον οργανισμό με ενέργεια (λίπος, λακτόζη), με δομικά συστατικά (πρωτεΐνες, ανόργανα άλατα) και με επαρκείς ποσότητες βιταμινών και ιχνοστοιχείων για την πραγματοποίηση των βιοχημικών διεργασιών που είναι απαραίτητες για τη ζωή (Καλατζόπουλος 1986, Καλατζόπουλος 1994).

Ειδικότερα επισημαίνεται ότι το γάλα ως οικοσύστημα διαθέτει: Πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας. Υδατάνθρακες εύπεπτους, χωρίς να ερεθίζουν το πεπτικό σύστημα, και με καταπραϋντικές ιδιότητες. Λιπαρά, σε μορφή γαλακτώματος, τα οποία είναι από τις πιο εύληπτες λιπαρές ουσίες. Τα μικροθρεπτικά στοιχεία που περιέχονται στο γάλα, κυρίως το ασβέστιο και ο φώσφορος, αποτελούν δομικά υλικά για τον οργανισμό. Επίσης, περιέχει ικανοποιητικές ποσότητες μαγνησίου και καλίου και είναι πλούσιο σε βιταμίνες A, D και B (Ανυφαντάκης 1986, Αρβανιτογιάννης και συν. 2001).

Το γάλα ως τρόφιμο, καταναλώνεται είτε νωπό (φρέσκο παστεριωμένο γάλα) είτε με την μορφή προϊόντων που έχουν παραχθεί από την επεξεργασία και τη μεταποίηση του (τυρί, βούτυρο, γιαούρτη). Γενικά, τα γάλατα που χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη κατανάλωση είναι το αγελαδινό, το αίγαιο, το πρόβειο, το βουβαλίσιο, το γάλα της καμήλας και το γαϊδουρινό. Τα γάλατα αυτά χαρακτηρίζονται από σημαντικές διαφοροποιήσεις αφενός, στα θρεπτικά συστατικά που περιέχουν και αφετέρου, στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Κάποια από αυτά (αγελαδινό, αίγαιο και πρόβειο γάλα) υπάρχουν στην αγορά τόσο με τη μορφή του νωπού παστεριωμένου γάλατος, όσο και με τη μορφή γαλακτοκομικών προϊόντων, ενώ άλλα γάλατα (βουβαλίσιο, γαϊδουρινό γάλα και γάλα καμήλας) χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή γαλακτοκομικών

προϊόντων ή και άλλων προϊόντων (π.χ. καλλυντικά από γαϊδουρινό γάλα). Σε παγκόσμια κλίμακα παρατηρείται μία μεγάλη ποικιλία προϊόντων που παράγονται από το γάλα διαφόρων θηλαστικών. Συχνά, τα προϊόντα αυτά είναι στενά συνδεδεμένα με το γενικότερο πολιτισμικό μόρφωμα των λαών και ιδιαίτερα με τις διατροφικές τους συνήθειες όπως αυτές καθορίζονται από τις επιδράσεις δημογραφικών, οικονομικών, γεωγραφικών και κλιματικών παραγόντων.

Ακολουθώντας τις διατάξεις του Ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, δίνεται ο κάτωθι ορισμός:

«Γάλα είναι το απηλλαγμένο πρωτόγαλακτος προϊόν της ολοσχερούς, άνευ διακοπής αμέλξεως υγιώς έχοντος γαλακτοφόρου ζώου, διαβιούντος και διατρεφόμενου υπό υγιεινούς όρους και μη ευρισκομένου εις κατάστασιν υπερκοπώσεως» (Κ.Τ.Π. 2003).

Επισημαίνεται ότι όταν η λέξη γάλα δεν συνοδεύεται από κάποιο επίθετο που να δηλώνει την προέλευσή του, θεωρείται αυτόματα ότι το γάλα είναι αγελαδινό. Όταν όμως προέρχεται από άλλο ζώο, υποχρεωτικά πρέπει να συνοδεύεται από λέξεις που να δηλώνουν την προέλευσή του (πρόβειο, γίδινο, βουβαλίσιο, κ.λπ.).

Σήμερα στον ελλαδικό χώρο, ως «νωπό γάλα», θεωρείται το γάλα που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες μιας ή περισσότερων αγελάδων, προβατινών, αίγων και βουβαλίδων, το οποίο δεν έχει θερμανθεί, πέραν των 40°C, ούτε έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με ισοδύναμο αποτέλεσμα (Καλατζόπουλος 1986, Καλατζόπουλος 1994).

Παραπλήσιοι ορισμοί για το γάλα δίδονται και στις νομοθεσίες άλλων χωρών:

- Για τους οργανισμούς **FAO** (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας του Ο.Η.Ε) / **WHO** , «γάλα είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που παίρνεται από μία ή δύο αμέλξεις χωρίς να προστεθεί ή ν' αφαιρεθεί τίποτε».
- Ο Κώδικας γάλακτος των Η.Π.Α., ορίζει ως γάλα το «έκκριμα του μαστού, το οποίο είναι απαλλαγμένο από πρωτόγαλα, παίρνεται με άμελξη μιας ή περισσότερων υγιών αγελάδων και το οποίο περιέχει τουλάχιστον 3,15% λίπος και 8,25% στερεά συστατικά άνευ λίπους».

Από ιστορικής άποψης, η ιστορία του γάλακτος είναι τόσο παλιά όσο και η εξημέρωση της κατσίκας και του προβάτου, πριν από 9.000 χρόνια, στα οροπέδια του Ιράν και του Αφγανιστάν. Η ακριβής ημερομηνία του πότε ο άνθρωπος χρησιμοποίησε για πρώτη φορά το γάλα των ζώων ως τροφή δεν υπάρχει κάπου αποτυπωμένη. Από κείμενα των Σουμέριων προκύπτει ότι ήδη και πριν το 6.000 π.Χ. ο άνθρωπος

εκμεταλλευόταν το γάλα των ζώων, ενώ στη Βίβλο η «Γη της Επαγγελίας» είναι η γη στην οποία «ρέει μέλι και γάλα» .

Η επιστήμη της γαλακτοκομίας άρχισε να αναπτύσσεται μετά τον 13^ο αιώνα και ειδικότερα μετά τον 19^ο, όταν άρχισαν να αναπτύσσονται και οι άλλες θετικές επιστήμες και κυρίως η Χημεία, η Βιοχημεία και η Μικροβιολογία. Τον 20^ο όμως αιώνα η Γαλακτοκομία σημειώνει, από τεχνολογική άποψη, αλματώδη εξέλιξη. Παράλληλα αυξάνεται και η παραγωγή του γάλακτος, ως συνέπεια της ανάπτυξης της επιστήμης της Ζωοτεχνίας.

Η Ελλάδα είναι η μοναδική χώρα στην Ευρωπαϊκή Ένωση, όπου η εγχώρια παραγωγή πρόβειου και αίγειου γάλακτος υπερβαίνει την παραγωγή αγελαδινού γάλακτος (59% έναντι 41%, αντίστοιχα). Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι η πορεία ανάπτυξης των γαλακτοκομικών κλάδων δεν ακολούθησε παράλληλη πορεία με τις υπόλοιπες χώρες της Ε.Ε.

Στην Ελλάδα την τελευταία εικοσαετία εκτρέφονται κατά μέσο όρο 9,01 εκ. πρόβατα και 5,12 εκ. κατσίκες. Το διαθέσιμο γενετικά ζωικό υλικό αποτελείται από ανομοιογενή ποίμνια και συγκροτείται από εγχώριες φυλές και μιγάδες με κριάρια ή τραγιά ελληνικών και ξένων φυλών. Η ελληνική προβατοτροφία και αιγοτροφία αποτελεί το 6,34% και 25,00%, αντίστοιχα του ευρωπαϊκού πληθυσμού αιγοπροβάτων. Εντούτοις από την επεξεργασία των δεδομένων της Ευρωπαϊκής Ένωσης διαφαίνεται τάση μείωσης του αριθμού των αιγοπροβάτων στην Ε.Ε., επειδή παρατηρείται μείωση της τάξεως του 27,11% στα πρόβατα και μείωση κατά 17,31% στις κατσίκες τη χρονική περίοδο από το 1995 - 2013 (Πηγή: F.A.O.STAT. 2015 - Επεξεργασία δεδομένων).

Απαιτείται συνεπώς ενίσχυση των εθνικών προγραμμάτων αύξησης της παραγωγής, τόσο του αγελαδινού, όσο και του αιγοπρόβειου γάλακτος, με παράλληλη βελτίωση της υγιεινής στάθμης και της ποιότητάς του.

Μέχρι σήμερα οι μέλετες που διαπραγματεύονται στοιχεία της ποιότητας του γάλακτος των μικρών μηρυκαστικών (κατσίκες - πρόβατα) είναι αριθμητικά πολύ λιγότερες συγκριτικά με αυτές που μελετούν το «αγελαδινό γάλα». Αυτό ήταν απόρροια του γεγονότος ότι παλαιότερα τα μικρά μηρυκαστικά θεωρούνταν ως μια μικρογραφία των μεγάλων μηρυκαστικών, θεωρία εντελώς εσφαλμένη ή μια «εγληματική» υπεραπλουστευμένη αντίληψη, αν κανείς λάβει υπ' όψη τη διαφορετικότητα στην ανατομία, τη φυσιολογία, τη διατροφή και την παθολογία ανάμεσα στα ανωτέρω αναφερθέντα θηλαστικά .

3.2.2 Σύσταση γάλακτος

Το γάλα μπορεί να περιγραφεί, ως ένα κολλοειδές εναιώρημα που περιέχει γαλακτοματοποιημένα σφαιρίδια λίπους, μια ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών, λακτόζη, άλατα, βιταμίνες και ένζυμα. Δείγματα γάλακτος θηλαστικών, που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, έχουν παρόμοια γενικά χαρακτηριστικά και περιέχουν μεγάλη ποικιλία όμοιων συστατικών, σε σημαντικά διαφορετικές όμως αναλογίες. Το είδος γάλακτος που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι το αγελαδινό, γιατί παράγεται σε μεγάλες ποσότητες, κατά κύριο λόγο, σε χώρες οικονομικά και τεχνολογικά προηγμένες. Αν και το αγελαδινό πλήρες γάλα είναι υγρή τροφή, περιέχει κατά μέσο όρο, περίπου 12% στερεά συστατικά, από τα οποία το 8,6% είναι στερεά συστατικά άνευ λίπους. Περιέχει σε μεγάλη, σχετικά, αναλογία, πρωτεΐνες, λίπος και λακτόζη που μαζί με άλατα αποτελούν τα κύρια συστατικά του και προσδιορίζουν τη διατροφική και εμπορική του αξία. Εκτός από τα κύρια συστατικά του περιέχει και εκατοντάδες άλλα συστατικά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις π.χ. βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και ένζυμα, που καθορίζουν τις βιολογικές και τεχνολογικές του ιδιότητες (Καλατζόπουλος 1986, Καλατζόπουλος 1994, Μάντης 1993).

Μελετώντας τη σύσταση του αγελαδινού γάλακτος, δίνοντας έμφαση στα κύρια και σε ορισμένα δευτερεύοντα συστατικά που είναι σημαντικά για τη διατροφή του ανθρώπου, ανακαλύπτουμε ότι το συστατικό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία στο αγελαδινό γάλα είναι το νερό, μέσα στο οποίο βρίσκονται σε διασπορά όλα τα άλλα συστατικά του, τα οποία αποτελούν το σύνολο των στερεών του συστατικών. Η λακτόζη είναι ο χαρακτηριστικός υδατάνθρακας του γάλακτος. Είναι αναγωγικός δισακχαρίτης που αποτελείται από γλυκόζη και γαλακτόζη. Το λίπος του γάλακτος αποτελείται από τριγλυκερίδια, τα λιπαρά οξέα των οποίων διαφέρουν πολύ ως προς το μέγεθος (2-20 άτομα C) και τον αριθμό των διπλών δεσμών (0-4 δ.δ.). Σε μικρότερες συγκεντρώσεις απαντούν και άλλα λιπίδια, όπως φωσφολιπίδια, χοληστερόλη, ελεύθερα λιπαρά οξέα και διγλυκερίδια. Το 80% των πρωτεϊνών του γάλακτος αποτελεί η καζεΐνη, η οποία είναι μίγμα, περίπου 10 διαφορετικών συστατικών και είναι αδιάλυτη σε pH 4,6. Το υπόλοιπο 20% των πρωτεϊνών, που είναι διαλυτό σε pH 4,6, αποτελείται από τις πρωτεΐνες του ορού και από πολυάριθμες άλλες πρωτεΐνες, όπως είναι τα ένζυμα, τα οποία αν και βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν σημαντική δραστηριότητα στο γάλα.

Τέλος, τα άλατα του γάλακτος είναι κυρίως απλά ή σύμπλοκα, ιονισμένα κατά ένα μέρος. Στην πλειονότητά τους είναι φωσφορικά, κιτρικά, χλωριούχα, θειικά, ανθρακικά και δισανθρακικά άλατα των K, Na, Ca, Mg. Τα άλατα του γάλακτος δεν περιγράφονται,

απολύτως με τους όρους «μεταλλικά» ή «ανόργανα» συστατικά, αφού πολλά από αυτά είναι οργανικά, όπως π.χ. τα κιτρικά (Ανυφαντάκης 1986, Μάντης, 1993). Στον Πίνακα 2 δίνεται ενδεικτική αποτύπωση των κύριων και δευτερευόντων συστατικών του αγελαδινού γάλακτος που είναι σημαντικά για τη διατροφή του ανθρώπου (Καμιναρίδης και Μοάτσου 2009).

Πίνακας 2: Κύρια και δευτερεύοντα συστατικά του αγελαδινού γάλακτος, σημαντικά για την διατροφή του ανθρώπου (ενδεικτική περιεκτικότητα).

Κύρια συστατικά		Δευτερεύοντα συστατικά			
	Περιεκτικότητα (%)	Μεταλλικά στοιχεία	Περιεκτικότητα (mg/l)	Βιταμίνες (mg/l)	Περιεκτικότητα (%)
Νερό	87,60	Ασβέστιο	1250	Βιταμίνη Α	0,
Στερεά συστατικά άνευ λίπους	8,65	Φώσφορος	1000	Βιταμίνη D	0,0006
Λακτόζη	4,75	Κάλιο	1500	Βιταμίνη Ε	0,98
Λίπος	3,75	Νάτριο	440	Θειαμίνη, Β1	0,44
Πρωτεΐνες	3,25	Χλώριο	1050	Ριβοφλαβίνη, Β2	1,75
Μεταλλικά στοιχεία	0,65	Μαγνήσιο	130	Νιασίνη	0,94
Οργανικά οξέα	0,18	Ψευδάργυρος	3,9	Παντοθενικό οξύ	3,46
Διάφορα άλλα συστατικά	0,14	Σίδηρος	Σίδηρος	Βιταμίνη Β6	0,64
				Βιοτίνη	0,031
				Φυλλικό οξύ	0,050
				Βιταμίνη Β12	0,0043
				Βιταμίνη C	21,1

3.2.2.1 Χημική σύσταση του γάλακτος προβάτου/αίγας

Όσα αναφέρθηκαν στα προηγούμενα για τη σύσταση του γάλακτος της αγελάδας, ισχύουν σε μεγάλο ποσοστό και για το γάλα των άλλων ειδών ζώων και κυρίως των μικρών μηρυκαστικών. Όμως υπάρχουν σημαντικές διαφορές ιδιαίτερα ως προς την εκατοστιαία αναλογία των βασικών συστατικών μεταξύ του γάλακτος των διαφόρων ειδών ζώων.

Σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα, το πρόβειο είναι πλουσιότερο σε στερεά συστατικά. Η εκατοστιαία αναλογία των συστατικών του παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις ανάλογα με τη φυλή, τη γαλακτική περίοδο και τη διατροφή. Η σύσταση του πρόβειου γάλακτος κατά την διάρκεια της γαλακτικής περιόδου παρουσιάζει αξιόλογη διακύμανση στην εκατοστιαία αναλογία ιδιαίτερα του λίπους και των πρωτεϊνών. Το λίπος παρουσιάζει σχετική μείωση μέχρι την 3η εβδομάδα και στη συνέχεια αυξάνεται. Κατά τη διάρκεια όμως από τα 3 στα 2 αρμέγματα, ανά 24ωρο, παρατηρείται απότομη πτώση της λιποπεριεκτικότητάς του (2-3%) και απαιτούνται 3-4 εβδομάδες για να ανέλθει και πάλι στα προηγούμενα επίπεδα (Ζυγογιάννης και Κατσαούνης 1984).

Την ίδια πορεία δείχνει και το κλάσμα των συνολικών στερεών, ενώ οι πρωτεΐνες (ολικό άζωτο) ύστερα από μια μικρή μείωση κατά την 1η – 3η εβδομάδα, αυξάνονται στα κανονικά τους επίπεδα (5,5-6,5%) για να παραμείνουν σχεδόν σταθερές για την υπόλοιπη γαλακτική περίοδο. Η λακτόζη, μετά από μια μικρή άνοδο στην αρχή της γαλακτικής περιόδου (2η εβδομάδα) μειώνεται ελαφρά και παραμένει σταθερή σε όλη την υπόλοιπη περίοδο. Το πρόβειο γάλα είναι πλουσιότερο σε λευκώματα και λίπος σε σχέση με το αγελαδινό ενώ στα υπόλοιπα συστατικά δεν υπάρχουν ουδιώσεις διαφορές. Έτσι το πρόβειο αποδίδει περισσότερο κατά την τυροκόμηση και παράγει γιαούρτη με μεγαλύτερο ιξώδες (Ζυγογιάννης και Κατσαούνης 1984).

Το γάλα της αίγας είναι πλουσιότερο σε στερεά συστατικά σε σύγκριση με το γάλα της αγελάδας. Η περιεκτικότητά του στα συστατικά αυτά, παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με τη φυλή, τη διατροφή, την υγιεινή κατάσταση του μαστού, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, και το ύψος της γαλακτοπαραγωγής των αιγών (Katsaounis et Zygoiannis 1986a, Katsaounis et Zygoiannis 1986b, Κατσαούνης 1986). Για παράδειγμα, το γάλα των μη βελτιωμένων φυλών αιγών έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε λίπη και πρωτεΐνες σε σύγκριση με το γάλα των βελτιωμένων φυλών. Επιπλέον, η διατροφή μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τόσο τη σύσταση του παραγόμενου γάλατος όσο και την ποσότητά του. Προς αυτή την κατεύθυνση, σημαντική είναι η σύνθεση του σιτηρεσίου που χορηγείται στα ζώα και ιδιαίτερα η αναλογία των συμπυκνωμένων και

των χονδροειδών ζωοτροφών. Επίσης, οι κασίκες, προς το τέλος της γαλακτικής τους περιόδου, παράγουν γάλα πλουσιότερο σε λίπη και πρωτεΐνες σε σύγκριση με το γάλα που παράγουν κατά την έναρξή της. Τέλος, σε κασίκες με υψηλή γαλακτοπαραγωγή, η περιεκτικότητα του γάλατος στα διάφορα συστατικά (με εξαίρεση τη λακτόζη) είναι χαμηλότερη εξαιτίας της μεγαλύτερης αραίωσης (Chilliard et al 2003). Γενικά, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπη αποτελούν σημαντικούς ποιοτικούς δείκτες του γάλατος που προορίζεται για την παραγωγή τυροκομικών προϊόντων, καθώς η απόδοση κατά την τυροκόμηση εξαρτάται κυρίως από την περιεκτικότητα του γάλατος σε καζεΐνες και δευτερευόντως σε λίπη, τα οποία, όμως, προσδίδουν τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στα γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται από το αίγαιο γάλα (Chilliard et al 2003, Morand-Fehr et al 2007).

3.2.3 Το γάλα ως τρόφιμο

Από τα αρχαία χρόνια το γάλα έχει σημαντική συνεισφορά στη διαίτα του ανθρώπου. Αποτελεί τη μοναδική και πλήρη τροφή κατά τα πρώτα στάδια της ζωής του νεογέννητου των θηλαστικών. Στον άνθρωπο, μετά από τους πρώτους μήνες της ζωής του, δεν επαρκεί για να καλύψει όλες τις ανάγκες του σε θρεπτικά συστατικά. Όμως αποτελεί μία άριστη τροφή και μία από τις σημαντικότερες πηγές πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, ασβεστίου, φωσφόρου, καθώς και ορισμένων βιταμινών. Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σημαντικά στη διατροφή του ανθρώπου, λόγω του ότι αποτελούν πηγή πολλών σημαντικών θρεπτικών συστατικών όπως πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες, βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Η Ελλάδα είναι χώρα με μεγάλη παράδοση στην κτηνοτροφία, ειδικότερα σε αυτή των μικρών μηρυκαστικών (αιγοπροβατοτροφία) αλλά και στην γαλακτοκομία. Η παραγωγική αυτή κατεύθυνση στηρίχθηκε στους άφθονους φυσικούς πόρους και προσαρμόστηκε στις ιδιαίτερες κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες της πατρίδας μας. Ο τομέας γαλακτοκομίας έχει ιδιαίτερη σημασία, τόσο για τη Γεωργική όσο και την Εθνική μας Οικονομία, γιατί εφοδιάζει τον πληθυσμό με προϊόντα υψηλής βιολογικής αξίας και δίνει απασχόληση σε χιλιάδες οικογένειες. Η χώρα μας συμβάλλει ελάχιστα στη διαμόρφωση της παραγωγής αγελαδινού γάλακτος της ΕΕ. Αντίθετα η συμβολή της σε πρόβειο και αίγαιο γάλα είναι σημαντική. Αλλά και σε παγκόσμιο επίπεδο, η συμβολή της χώρας σε πρόβειο και αίγαιο γάλα είναι σημαντική. Έχουμε τη μεγαλύτερη κατά κάτοικο παραγωγή σε πρόβειο και σε αίγαιο γάλα στον κόσμο. Η ετήσια ελληνική γαλακτοπαραγωγή ανέρχεται περίπου σε 1.800.000 τόνους. Το παραγόμενο πρόβειο και αίγαιο γάλα κατευθύνεται σε διάφορες χρήσεις με κύρια την

παραγωγή τυριών (90%), ενώ το αγελαδινό για εμφιάλωση σε ποσοστό 80% (Μασούρας & Θ 2015). Από το σύνολο του παραγόμενου γάλακτος παρασκευάζονται ετησίως περίπου: 200 - 220.000 τόνοι τυριών, εκ των οποίων το 90% παράγονται από αιγοπρόβειο γάλα. Το 57% των παραγομένων τυριών είναι τυριά Προϊόντα Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ), με τη φέτα να καταλαμβάνει το 90% (Μασούρας 2015). Η κατανάλωση γάλακτος σε βιομηχανικές χώρες σταθεροποιήθηκε με πτωτικές τάσεις όμως τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς η ζήτησή του μειώθηκε επειδή οι καταναλωτές αγοράζουν αθρακούχα αναψυκτικά και χυμούς (Φώτου 2018). Απ' ότι διαφαίνεται, δεν θα υπάρξουν αισθητές αλλαγές στην κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων (βούτυρο και τυρί) σε παγκόσμιο επίπεδο στο μέλλον. Η τάση αυτή ανταποκρίνεται στις αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών για υγιεινότερα και πιο φυσικά ζωικά προϊόντα. Σύμφωνα με την ρέουσα πεποίθηση του καταναλωτή ανάμεσα στα προϊόντα που χαρακτηρίζονται ως «υγιεινά τρόφιμα – health food» βρίσκεται και το νωπό, μη παστεριωμένο γάλα (Lucey 2015, Popovic-Vranjes et al 2015).

Το νωπό γάλα ορίζεται από τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης ως: "το έκκριμα του μαστικού αδένου των εκτρεφόμενων ζώων το οποίο δεν έχει θερμανθεί σε θερμοκρασία άνω των 40°C ή που δεν έχει υποστεί οποιαδήποτε επεξεργασία ισοδύναμου αποτελέσματος" (Κανονισμός EC 2004). Ενώ αν και δεν υπάρχει κοινά αποδεκτός παγκοσμίως ορισμός του φρέσκου γάλακτος, συνήθως η εφαρμοσμένη πρακτική είναι η χρήση του παστεριωμένου γάλακτος, ως φρέσκου γάλακτος. Σήμερα η κατανάλωση νωπού γάλακτος στον γενικό πληθυσμό είναι μάλλον χαμηλή, ενώ παρουσιάζεται αυξημένη στις περιπτώσεις καταναλωτών, οι οποίοι επιθυμούν να καταναλώνουν φυσικά μη επεξεργασμένα τρόφιμα και πιστεύουν ότι το νωπό, μη παστεριωμένο γάλα χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερες ιδιότητες, μειωμένες πιθανότητες πρόκλησης αλλεργιών, αυξημένη θρεπτική αξία και καλύτερη γεύση. Η προσέγγιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την κατανάλωση γάλακτος από άτομα με ιδιαίτερες διατροφικές απαιτήσεις, όπως ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς, άτομα με ειδικές διατροφικές ανάγκες και συνήθειες, καθώς και από άτομα τρίτης ηλικίας και παιδιά. Στην Ευρώπη, το νωπό γάλα μπορεί να διατίθεται στον καταναλωτή με πολλούς τρόπους μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται η άμεση πώληση στους καταναλωτές στο αγρόκτημα και η πώληση μέσω αυτόματων μηχανημάτων. Στη Γερμανία, τη Γαλλία, το Βέλγιο, τη Δανία, την Ιταλία την Ιρλανδία και σε κάποιες περιοχές του Ηνωμένου Βασιλείου, το νωπό αγελαδινό γάλα είναι δυνατόν να φτάσει στον καταναλωτή με άμεση αγορά από αγροκτήματα, ενώ στην Πολωνία, την Ισπανία και τη Νορβηγία η παραπάνω διαδικασία απαγορεύεται. Στις Ηνωμένες Πολιτείες

Αμερικής η άμεση πώληση γάλακτος, ή η αγορά του μέσω προγραμμάτων χρηματοδοτικής μίσθωσης και η πώλησή του ως "ζωοτροφή ή τροφή για ζώα συντροφιάς" χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα για την προμήθεια νωπού γάλακτος από τους καταναλωτές . Το ενδιαφέρον για κατανάλωση νωπού μη παστεριωμένου γάλακτος ή προϊόντων που παρασκευάζονται από αυτό, συνεχώς αυξάνεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση (EFSA 2015) και στις Ηνωμένες Πολιτείες, παρά το γεγονός ότι η πρακτική αυτή ενέχει μικροβιολογικούς κινδύνους οι οποίοι σχετίζονται με την υγεία του καταναλωτή. Πολλές έρευνες κατέγραψαν την παρουσία τροφιμογενών παθογόνων σε νωπό γάλα από δεξαμενές συγκέντρωσης καθώς και την πρόκληση επιδημιών στον άνθρωπο, μέσω της κατανάλωσης νωπού γάλακτος, οφειλόμενων στα βακτηριακά γένη και είδη όπως *Campylobacter*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* και *Shiga Toxin – Production E.coli Infections (STEC)*, επισημαίνοντας τις απειλές για την ανθρώπινη υγεία που προκαλεί η κατανάλωση νωπού γάλακτος και των παραγόμενων από αυτό γαλακτοκομικών προϊόντων (Oliver et al 2005, Cancino-Padilla et al 2017, Paswan and Park 2020).

3.2.4 Η προέλευση των μικροοργανισμών που απαντούν στο γάλα - Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά και υγιεινή

Η μεγάλη βιολογική αξία του γάλακτος ως τροφής, που αποδεικνύεται από το γεγονός ότι αποτελεί τη μοναδική τροφή για την ανάπτυξη των νεογνών αλλά και των νεαρών ζώων, είναι η αιτία για την απρόσκοπτη ανάπτυξη σ' αυτό διαφόρων μικροοργανισμών.

Επομένως, όταν υπάρχουν ευνοϊκές συνθήκες, κυρίως θερμοκρασίας, σε σύντομο χρονικό διάστημα τα συστατικά του αλλοιώνονται σε βαθμό που η παραγωγή προϊόντων ποιότητας είναι αδύνατη (Φωτογραφία 1).

Δεδομένου ότι, όπως και για κάθε άλλο προϊόν η ποιότητα της πρώτης ύλης αποτελεί βασική προϋπόθεση επιτυχίας, απαιτείται καλή γνώση: **1)** των πηγών μόλυνσής αυτού **2)** των τρόπων αποτροπής μόλυνσης - προστασίας και **3)** τα είδη των μικροοργανισμών και των ιδιοτήτων τους, που απαντώνται στο γάλα.

Το γάλα θεωρείται στείρο καθώς εκκρίνεται από τις κυψελίδες του μαζικού αδένου του ζώου . Ωστόσο, η υψηλή περιεκτικότητά του σε ποικίλα θρεπτικά συστατικά και νερού σε συνδυασμό με το σχεδόν ουδέτερο pH, το καθιστούν άριστο μέσο ανάπτυξης πολλών μικροοργανισμών. Η μικροβιακή μόλυνση του γάλακτος μπορεί να συμβεί από τρεις κύριες πηγές: **α)** από το μαστό του ζώου, **β)** από το εξωτερικό του μαστού και **γ)** από τις

επιφάνειες και τον εξοπλισμό κατά το χειρισμό από τους παραγωγούς και τους χειρισμούς κατά την αποθήκευσή του.

Η ενδογενής μόλυνση του γάλακτος μπορεί να οφείλεται σε συστηματικές λοιμώξεις των γαλακτοπαραγωγών ζώων ή σε εντοπισμένες λοιμώξεις όπως η μαστίτιδα, φλεγμονή του μαστικού αδένου. Το γάλα που παράγεται από ζώα που παρουσιάζουν κλινική μαστίτιδα έχει συνήθως αλλοιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (μπορεί να περιέχει πήγματα ή αίμα ή μπορεί ακόμη να παρουσιάζει αλλαγές του χρώματος) και συνεπώς αυτό το προϊόν είναι ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση. Από την άλλη πλευρά, το γάλα από ζώα με υποκλινική μαστίτιδα δεν παρουσιάζει οργανοληπτικές διαφορές σε σχέση με εκείνο που παράγεται από ζώα που δεν νοσούν και στην περίπτωση που αναμειχθεί στις δεξαμενές συγκέντρωσης των εκτροφών, εισέρχεται στην τροφική αλυσίδα και αποτελεί απειλή για τη δημόσια υγεία. Η μαστίτιδα είναι δυνατό να προκληθεί από περισσότερους από 150 διαφορετικούς μικροοργανισμούς, στους οποίους περιλαμβάνονται βακτηρίδια, μυκοπλάσματα και ζυμομύκητες.

Τα περισσότερα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια όπως η *Salmonella*, το *Campylobacter* και η *Shiga Toxin – Production E.coli Infections (STEC)* δεν απομονώνονται συχνά από το μαστικό γάλα, αν και βρίσκονται στον γαστρεντερικό σωλήνα των μηρυκαστικών. Η παρουσία τέτοιων βακτηρίων σε νωπό γάλα προερχόμενο από δεξαμενές συγκέντρωσης, φαίνεται να προκύπτει από κοπρανώδη μόλυνση που λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία του αρμέγματος. Για παράδειγμα, μελέτη που εκπονήθηκε από ερευνητές έδειξε ότι το μικροβιακό προφίλ και οι ορότυποι της εντεροτοξινογόνου *Shiga Toxin – Production E.coli Infections (STEC)* ήταν αξιοσημείωτα παρόμοια με τα αντίστοιχα που απομονώθηκαν από τα κόπρανα αυτών των ζώων. Οι ερευνητές αυτοί κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα παραγωγικά ζώα αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή STEC στην τροφική αλυσίδα.

Επιπλέον, η μικροβιακή επιμόλυνση του νωπού γάλακτος μπορεί επίσης να προκληθεί μέσω των μολυσμένων αρμεκτικών μηχανών ή των χεριών των αρμεκτών και λόγω κακών συνθηκών χειρισμού και αποθήκευσης του γάλακτος πριν από την κατανάλωση (Φώτου 2018). Γενικά, εάν δεν υπάρχει ενδομαστική λοίμωξη ή συστηματική ασθένεια του ζώου, το γάλα στον μαστικό αδένου στο σημείο της παραγωγής του, δεν πρέπει να περιέχει μικροοργανισμούς ή τοξίνες τους. Ωστόσο, παρά τις προσπάθειες ελαχιστοποίησης της εμφάνισης παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο νωπό γάλα, δεν είναι δυνατόν αυτοί να εξαλειφθούν εξ ολοκλήρου. Έχει δηλωθεί ότι όλοι οι παράγοντες, δηλαδή η υγεία και η υγιεινή του

ζώου, το περιβάλλον της εκμετάλλευσης, οι διαδικασίες που ακολουθούνται για τον καθαρισμό και την εξυγίανση του εξοπλισμού αρμέγματος, η θερμοκρασία και η διάρκεια αποθήκευσης, επηρεάζουν το επίπεδο της μικροβιακής μόλυνσης και τα είδη των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο νωπό γάλα.

Στη μικροβιακή χλωρίδα των γαλακτοπαραγωγών ζώων, συνήθως κυριαρχούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria), τα οποία περιλαμβάνουν κυρίως τα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* και *Enterococcus*. Το γάλα ως πηγή παθογόνων μικροοργανισμών για τον άνθρωπο, εξετάστηκε από την ερευνητική ομάδα.

Παθογόνα βακτήρια που κυριαρχούν στο νωπό γάλα, τα οποία δυνητικά μεταδίδονται στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης αυτού και μπορεί να αποτελέσουν αιτία σοβαρών τροφολοιμώξεων περιλαμβάνουν τα ακόλουθα βακτηριακά γένη/είδη: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus suis* subsp. *zooepidemicus*. Μεγάλη συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης νωπού γάλακτος και ανθρώπινων λοιμώξεων βρέθηκε επίσης στην περίπτωση των βακτηρίων των γενών *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shiga Toxin – Production E.coli Infections (STEC)*, *Brucella melitensis*, *Mycobacterium bovis* και *Tick-borne encephalitis virus (TBEV)*. Άλλοι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από νωπό γάλα ανήκουν στην οικογένεια των εντεροβακτηριακών, στο γένος *Micrococcaceae*, στις ζύμες και τους ζυμομύκητες. Όσον αφορά στους βιολογικούς κινδύνους στο σύνολό τους στην ΕΕ, η ομάδα εμπειρογνομώνων της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA), πρόσφατα προσδιόρισε στους κύριους μικροβιολογικούς κινδύνους που σχετίζονται με την κατανάλωση γάλακτος διαφορετικών ειδών ζώων και τη δημόσια υγεία στην ΕΕ. Η παρουσία αυτών των παθογόνων μικροοργανισμών που ταυτοποιήθηκαν από δείγματα νωπού γάλακτος διαφορετικών ειδών ζώων παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Μικροβιολογικοί κίνδυνοι που ανευρίσκονται στο νοπό γάλα διαφόρων ειδών ζώων, οι οποίοι είναι δυνατό να μεταφερθούν στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης αυτού (Zastempowska et al 2016).

Microbiological hazards	Animal species	Reference
<i>Brucella melitensis</i>	goat	Ramos et al. (2008)
<i>Campylobacter</i> spp. (thermophilic)	cow	Bianchi et al. (2013) Jay-Russell et al. (2013)*
	goat	Harris et al. (1987)*
	sheep	FSA (1999)
<i>Mycobacterium bovis</i>	cow	Doran et al. (2009)* Passchyn et al. (2012)
<i>Salmonella</i> spp.	cow	Bianchi et al. (2013) Tacket et al. (1985)*
	sheep	Fotou et al. (2011)
	camel	Abeer et al. (2012) Al-Tofaily and Al rodhan (2011)
Shigatoxin-producing <i>E. coli</i> (STEC)	cow	Martin and Beutin (2011) Solomakos et al. (2009)
	goat	Bielaszewska et al. (1997)* FSA (1999) Martin and Beutin (2011) Solomakos et al. (2009)
	sheep	Martin and Beutin (2011) Solomakos et al. (2009)
	buffalo	Şeker and Yardimci (2008)
	camel	Abeer et al. (2012)
Tick-borne encephalitis virus (TBEV)	cow	Caini et al. (2012)* Cisak et al. (2010)
	goat	Cisak et al. (2010) Hudopisk et al. (2013)* Kohl et al. (1996)* Matuszczyk et al. (1997)*
	sheep	Cisak et al. (2010)



Φωτογραφία 1: Σκίτσιο του *Harper's Weekly* που αποτυπώνεται τις ολέθριες συνέπειες της κατανάλωσης αλλοιογόνου γάλακτος (August 17, 1878 / HathiTrust).

3.2.4.1 Κυριότερα γένη βακτηρίων που μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης γάλακτος

Το γάλα αποτελεί σημαντική δεξαμενή παθογόνων παραγόντων, καθώς μπορεί να φιλοξενήσει ποικιλία μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί δείκτες υγιεινής του γάλακτος είναι ομάδες ή είδη μικροοργανισμών που μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν και των οποίων η παρουσία, όταν ξεπερνά ορισμένα προκαθορισμένα όρια, θεωρείται ένδειξη παραμονής του τροφίμου σε συνθήκες, στις οποίες είτε είναι πιθανή η μόλυνσή του με παθογόνους μικροοργανισμούς, ή ευνοείται η ανάπτυξή τους. Ο προσδιορισμός των μικροοργανισμών δεικτών στο γάλα είναι απαραίτητος τόσο για τον έλεγχο της υγιεινής κατάστασης αυτού όσο και για έλεγχο της ποιότητάς του.

Συγκεκριμένα τα κύρια γένη βακτηρίων τα οποία μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης γάλακτος παρουσιάζονται παρακάτω:

- Οικογένεια *Pseudomonaceae*: Το κυριότερο γένος της οικογένειας είναι το *Pseudomonas*. Στην οικογένεια αυτή, κατατάσσεται και το γένος *Brucella* που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αν και υπάρχουν αμφιβολίες για την συγγενεία του με την οικογένεια αυτή. Τα γένη της οικογένειας αυτής είναι αρνητικά κατά Gram, ραβδία ευθύγραμμη ή καμπυλοειδή και αποκλειστικά αερόβια.
- Γένος *Pseudomonas*: Τα σπουδαιότερα είδη του γένους *Pseudomonas* είναι το *Pseudomonas aeruginosa* και *Pseudomonas fluorescens*.
- Γένος *Brucella*: Το γένος αυτό περιλαμβάνει δύο είδη που είναι παθογόνα για τα ζώα και τον άνθρωπο. Προκαλούν την γνωστή αρρώστια βρουκέλλωση (μελιταίος πυρετός) που είναι αρκετά διαδεδομένη στην χώρα μας. Η διάρκεια επώασης του μικροοργανισμού είναι 2-4 εβδομάδες. Πρόκειται για μια σοβαρή αρρώστια που σε ποσοστό 2% είναι θανατηφόρα. Τα σπουδαιότερα είδη τους γένους *Brucella* είναι τα *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*.
- Οικογένεια *Enterobacteriaceae*: Πρόκειται για αρνητικά κατά Gram, διαστάσεων 0,3-1,0×1,0- 6,0 μm, ευθέα ραβδία και είναι κινητά εφόσον έχουν περίτριχες βλεφαρίδες. Είναι ασποριογόνα με κάψα ή όχι και ο μεταβολισμός τους είναι ζυμωτικός και οξειδωτικός. Χαρακτηρίζονται αερόβια ή ελαφρώς αναερόβια, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C. Τα περισσότερα γένη ζουν στο πεπτικό σύστημα των ζώων και του ανθρώπου, μερικά μάλιστα, από αυτά προκαλούν εντερικές διαταραχές. Μερικά επίσης, γένη είναι παθογόνα των φυτών και κάποια άλλα σαπρόφυτα. Δεν χαρακτηρίζονται για την θερμοανθεκτικότητά τους και

καταστρέφονται με την παστερίωση. Κάποια από αυτά χαρακτηρίζονται διεθνώς με τον όρο «κολοβακτήρια» (*Coliform*) και ορίζονται ως αρνητικά κατά Gram, αρνητικά στην οξειδάση βακτήρια, μη σποριογόνα που αναπτύσσονται σε άγαρ με χολικά άλατα, που δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη θετικών κατά Gram βακτηρίων, αλλά ευνοούν την ανάπτυξη των κολοβακτηριοειδών και ζυμώνουν τη λακτόζη σε 48 h στους 37°C παράγοντας οξύ και αέριο. Ο έλεγχος για την παρουσία των γενών της οικογένειας αυτής στο νωπό γάλα δεν έχει νόημα, γιατί πάντα το νωπό γάλα επιμολύνεται από αυτά, δεδομένου ότι αφθονούν στο πεπτικό σύστημα και το εντερικό σωλήνα των ζώων. Δεδομένου ακόμα, ότι όλα τα γένη καταστρέφονται με την παστερίωση, τυχόν παρουσία τους στο παστεριωμένο γάλα δείχνει επιμόλυνση μετά το στάδιο της παστερίωσης. Για το λόγο αυτό, ο έλεγχος για την παρουσία κολοβακτηρίων έχει μεγάλη σημασία στο παστεριωμένο γάλα. Κυριότερα γένη: *Esherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Erwinia* *Providencia*, *Morganella*.

- Οικογένεια *Vibrionaceae*: Από τα γένη της οικογένειας αυτής μόνο τα εξής τέσσερα έχουν βρεθεί στο γάλα και σε γαλακτοκομικά προϊόντα: *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium* και *Vibrio*. Τα γένη αυτά έχουν κύτταρα σε σχήμα ραβδίου, είναι αρνητικά κατά Gram, είναι μεσόφιλα ή ψυχρότροφα και προέρχονται από το έδαφος ή το νερό. Μερικά παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα θερμοάντοχα και συνδέονται με αλλοιώσεις γάλακτος και προϊόντα με ανάπτυξη των ψυχρότροφων αυτών μικροοργανισμών. Επιπλέον, το *Flavobacterium* έχει συνδεθεί με την αύξηση του ιζώδους του γάλακτος μετά την διατήρησή του στους 4°C.
- Οικογένεια *Neisseriaceae*: Από τα γένη αυτής της οικογένειας ενδιαφέρον παρουσιάζει το γένος *Acinetobacter* και μια κατηγορία μικροοργανισμών γνωστή με το όνομα *Moraxella*, που διαφέρει σε μερικά χαρακτηριστικά από αυτά που έχουν τα είδη του γένους *Acinetobacter*. Από πλευράς μορφολογίας τα κύτταρα των γενών της οικογένειας αυτής είναι ραβδόμορφα. Είναι αρνητικά κατά Gram, αερόβια, μεσόφιλα ή ψυχρότροφα και προέρχονται από το νερό. Η κατηγορία των *Moraxella* περιλαμβάνει παθογόνους μικροοργανισμούς για τον άνθρωπο, ενώ τα είδη του *Acinetobacter* έχουν συνδεθεί με αλλοιώσεις λόγω της ανάπτυξής τους σε θερμοκρασία ψυγείου και την παραγωγή ενζύμων που διασπούν τα συστατικά του

γάλακτος. Τέλος, το είδος *Acinetobacter viscolactis* έχει συνδεθεί με την αύξηση του ιξώδους του γάλακτος.

- Οικογένεια *Micrococcaceae*: Από τα γένη αυτής της οικογένειας δύο παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον για το γάλα, το *Micrococcus* και το *Staphylococcus*. Έχουν σφαιρικό σχήμα, είναι θετικά κατά Gram, αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. Τα είδη του γένους *Micrococcus* διαφοροποιούνται από εκείνα του γένους *Staphylococcus*, λόγω της ικανότητας των σταφυλόκοκκων να ζυμώνουν τη γλυκόζη. Ωστόσο, οι σταφυλόκοκκοι, με αρνητική αντίδραση Coagulase, είναι δύσκολο να διακριθούν από τα είδη των *Micrococcus* με βάση μόνο αυτό το κριτήριο. Το πρόβλημα της διαφοροποίησης, στην περίπτωση αυτή, μπορεί να λυθεί με άλλους ελέγχους που βασίζονται στα χαρακτηριστικά των κυτταρικών τοιχωμάτων.
- Οικογένεια *Streptococcaceae*: Από την συγκεκριμένη οικογένεια για την γαλακτοκομία παρουσιάζουν ενδιαφέρον τα γένη *Streptococcus* και *Leuconostoc*. Χαρακτηρίζονται από σφαιρικά ή ωοειδή κύτταρα, σε δυάδες, τετράδες ή αλυσίδες. Είναι θετικά κατά Gram και προαιρετικά αναερόβια. Η οικογένεια αυτή, περιλαμβάνει μικροοργανισμούς χρήσιμους για την παρασκευή ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, αλλά επιβλαβείς και παθογόνους με σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία των ζώων (μαστίτιδα) και στην παραγωγή του γάλακτος.
- Οικογένεια *Bacillaceae*: Από τα γένη της οικογένειας αυτής, ενδιαφέρον για την γαλακτοκομία παρουσιάζουν τα γένη *Bacillus* και *Clostridium*. Τα γένη αυτά μπορεί να είναι αερόβια, προαιρετικά αναερόβια ή αναερόβια, ραβδία, διαστάσεων 0,3-2,2×1,2-7,0 μm. Είναι θετικά κατά Gram, αν και η συμπεριφορά τους στη χρώση Gram αλλάζει με την αύξηση της ηλικίας των κυττάρων. Τα κύτταρα έχουν σχήμα ραβδίου και μπορεί να εμφανιστούν μεμονωμένα, διπλά ή σε αλυσίδες. Βέβαια, το ενδιαφέρον των μικροοργανισμών της οικογένειας αυτής για την γαλακτοκομία έχει σχέση με: (α) Την θερμοανθεκτικότητά τους, λόγω παραγωγής σπορογόνων μορφών, (β) Την ανάπτυξή τους σε θερμοκρασία ψυγείου (ψυχρότροφα), (γ) Και την ικανότητα ανάπτυξής τους σε αναερόβιο περιβάλλον (γάλα σε εγκυτιωμένους περιέκτες και σε τυροκομικά προϊόντα).
- Οικογένεια *Lactobacillaceae*: Από τα γένη αυτής της οικογένειας ενδιαφέρον για το γάλα παρουσιάζει, κυρίως, το γένος *Lactobacillus* και, δευτερευόντως, το γένος *Listeria*, το οποίο είναι αμφιβόλου συγγένειας με αυτή την οικογένεια. Τα

συγκεκριμένα γένη είναι θετικά κατά Gram, με κύτταρα ευθύγραμμου ή καμπυλοειδούς ραβδίου και είναι αερόβια ή προαιρετικά αερόβια.

- Οικογένεια *Propionibacteriaceae*: Από τα γένη αυτής της οικογένειας, μόνο το γένος της *Propionibacterium* αποκτά ενδιαφέρον για το γάλα και τα προϊόντα του. Το είδος *P. shermanii* χρησιμοποιείται, σε συνδυασμό με είδη του γένους *Lactobacillus* στην παρασκευή ελβετικού τύπου τυριού. Στο τυρί βοηθάει στο σχηματισμό οπών με την παραγωγή CO₂. Είναι θετικό κατά Gram, προαιρετικώς αναερόβιο και έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30-37°C.
- Οικογένεια *Mycobacteriaceae*: Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει μόνο ένα γένος, το *Mycobacterium*. Δεν χρωματίζεται εύκολα με τη χρώση κατά Gram, αλλά συνήθως θεωρούνται θετικά κατά Gram. Είναι αερόβια, διαστάσεων 0,2-0,7×1,0-10,0 και το σχήμα τους εμφανίζεται ως κοκκοειδές ή νηματώδες.
- Οικογένεια *Rickettsiaceae*: Στην οικογένεια αυτή ανήκει το γένος *Coxiella* που περιλαμβάνει το είδος *C. burnetii*, το οποίο είναι παράσιτο, κυρίως, των τσιμπουριών και μεταδίδεται, στη συνέχεια και στα ζώα. Είναι παθογόνο και στον άνθρωπο και είναι ικανό να προκαλέσει τον πυρετό Q που σπάνια είναι θανατηφόρος. Το *C. burnetii* συνδέθηκε με την εξέλιξη της παστερίωσης του γάλακτος, λόγω της μεγαλύτερης ανθεκτικότητάς του στη θέρμανση από τους μικροοργανισμούς της φυματίωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.

ΠΑΣΤΕΡΙΩΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

4.1 Ιστορία της παστερίωσης

Η παστερίωση του γάλακτος θεωρείται πλέον δεδομένη. Ωστόσο, η κατανόηση της ιστορίας της παστερίωσης του γάλακτος, η οποία είναι μακρά και χαρακτηρίζεται από περιόδους αμφιλεγόμενης πρακτικής, αποτελεί βασική προϋπόθεση για την επιστημονική αξιολόγηση της διαδικασίας.

Οι συστάσεις για θέρμανση του γάλακτος στο σπίτι πριν τραφούν τα βρέφη καταγράφηκαν ήδη από το 1824, 40 χρόνια πριν από τα πρώτα πειράματα του Pasteur (Εικόνα 12) (Rankin et al 2017). Το 1911, η Εθνική Επιτροπή Προτύπων Γάλακτος στις Ηνωμένες Πολιτείες ήταν ο πρώτος επαγγελματικός οργανισμός που συνιστούσε ένα ελάχιστο συνδυασμό χρόνου και θερμικής επεξεργασίας, για την παστερίωση του γάλακτος: 62,8 °C για 30 min (Vermont Dairymen's Association 1910, Vermont Dairymen's Association 1911). Αυτή η θερμική επεξεργασία ήταν ελαφρώς υψηλότερη από ό, τι πολλοί άνθρωποι κατά την εποχή εκείνη θεωρούσαν επαρκή θερμική έκθεση για την καταστροφή του *Mycobacterium tuberculosis*, ενός από τους κύριους παθογόνους παράγοντες που αφορούσε το γάλα εκείνης της εποχής.

Ωστόσο, μόνο μετά από περαιτέρω έρευνα και διερεύνηση των δυνατοτήτων του διαθέσιμου εμπορικού εξοπλισμού, η θέρμανση του γάλακτος στους 63 °C σε ανοιχτές δεξαμενές και η διατήρηση της θερμοκρασίας αυτή για περίπου 30 min, ονομάστηκε «μέθοδος συγκράτησης» ή μέθοδος χαμηλής θερμοκρασίας για μεγάλο χρονικό διάστημα και αναγνωρίστηκε αρχικά επίσημα και νομικά ως η κατάλληλη μέθοδος θερμικής επεξεργασίας στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπου το 1924, εγκρίθηκε το πρώτο διάταγμα για το παστεριωμένο γάλα. Στο διάταγμα, η παστερίωση ορίστηκε ως «διαδικασία θέρμανσης», όχι μικρότερη από 61,1 °C για 30 min σε εγκεκριμένο εξοπλισμό» (Rankin et al 2017).

Μετά από περαιτέρω μελέτες σχετικά με τη θερμική καταστροφή του *M. tuberculosis* και άλλων παθογόνων, το πρότυπο της Παστερίωσης HTST (High Temperature Short Time) – 72 °C για 15 sec, συμπεριλήφθηκε στην έκδοση του 1933 του Υπουργικού Διατάγματος στον κώδικα για το γάλα υγειονομικής σημασίας των ΗΠΑ. Η επίδραση της κατεργασίας HTST στην ικανότητα δημιουργίας κρέμας γάλακτος λήφθηκε επίσης υπόψη κατά τον καθορισμό του προτύπου (Rankin et al 2017).

Στα τέλη της δεκαετίας του 1930, έγινε φανερό ότι η ρικέτσια *Coxiella burnetii*, ο αιτιώδης παράγοντας του πυρετού Q, ήταν πιο ανθεκτική στη θερμότητα από το *M. tuberculosis / bovis*. Μελέτες που δημοσιεύθηκαν το 1956 έδειξαν ότι εάν κύτταρα της *C. burnetii* ήταν παρόντα στο νωπό γάλα σε μεγάλους αριθμούς, μικρό ποσοστό αυτών μπορεί να επιβιώσουν στους 61,7 °C για 30 min. Αυτές οι μελέτες κατέληξαν σε μια σύσταση της Υπηρεσίας Δημόσιας Υγείας των ΗΠΑ να αυξήσει το πρότυπο για τη «μέθοδο συγκράτησης» παστερίωσης σε 62,8 °C για 30 min. Προτάθηκε επίσης να προστεθεί τουλάχιστον ένα θερμοκρασιακό παράθυρο επιπλέον 2,8 °C στη θερμοκρασία συγκράτησης για προϊόντα με περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες υψηλότερη από το πλήρες γάλα ή με προσθήκη ζάχαρης.

Εκτός από ορισμένες στρογγυλοποιήσεις των αριθμών για να ληφθούν υπόψη οι μετατροπές ανάμεσα σε βαθμούς Φαρενάιτ-Κελσίου, τα παραπάνω πρότυπα παστερίωσης παρέμειναν αμετάβλητα μέχρι σήμερα. Σύμφωνα με την Διεθνή Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων, οι ελάχιστοι συνδυασμοί χρόνου και θερμοκρασίας που αναγνωρίζονται παγκοσμίως είναι 63 °C για 30 min ή 72 °C για 15 sec.

Τυπικοί ελάχιστοι συνδυασμοί χρόνου-θερμοκρασίας που χρησιμοποιούνται για την παστερίωση της κρέμας γάλακτος έχουν ως εξής:

- Μέθοδος συγκράτησης (παρτίδα): 65 °C για 30 min.
- Μέθοδος HTST για κρέμα γάλακτος με λίπος 10-20%: 75 °C για 15 sec.
- Μέθοδος HTST για κρέμα με > 20% λίπος: 80 °C για 15 sec.



Εικόνα 12: Η παστερίωση στα χρόνια του L. Pasteur.

4.2 Μέθοδοι για τον προσδιορισμό της θερμικής αντοχής παθογόνων βακτηρίων και της ερμηνείας των δεδομένων

Πολλές διαφορετικές τεχνικές και είδη εξοπλισμού έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της θερμικής αντοχής των παθογόνων που μεταδίδονται με το γάλα, που κυμαίνονται από το πολύ απλό έως το πολύ εξελιγμένο και από τη μικροκλίμακα έως την εμπορική κλίμακα. Ωστόσο, υπάρχουν πολλές ενδείξεις που δείχνουν ότι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αντοχής στη θερμότητα αποτελεί μείζονα παράγοντα για τον προσδιορισμό **(i)** της αξιοπιστίας των παραγόμενων δεδομένων αντοχής στη θερμότητα και **(ii)** της συνέπειάς της με την εμπορική πρακτική παστερίωσης. Συνεπώς, πρέπει να λαμβάνεται πάντοτε υπόψη η μεθοδολογία κατά την αξιολόγηση της αξιοπιστίας οποιωνδήποτε συμπερασμάτων σχετικά με την ικανότητα ενός οργανισμού να επιβιώνει / καταστρέφεται με εμπορικές μεθόδους θερμότητας.

Από εμπορική άποψη, η συνολική επίδραση του ενσωματωμένου πρωτοκόλλου θερμότητας, συν οποιωνδήποτε άλλων σχετικών εισροών συστήματος, στην επιβίωση / καταστροφή οποιωνδήποτε παθογόνων που μπορεί να υπάρχουν στο νωπό γάλα σε οποιαδήποτε δεδομένη ημέρα, είναι αυτό που έχει σημαντική βαρύτητα. Άλλες εισόδους συστήματος κατά τη διάρκεια της εμπορικής επεξεργασίας περιλαμβάνουν την τυρβώδη ροή και, σε ορισμένες περιπτώσεις, την ομογενοποίηση. Έτσι πρέπει να δοθεί μεγαλύτερο βάρος στα αποτελέσματα των μελετών αντοχής στη θερμότητα που πραγματοποιήθηκαν με χρήση του πραγματικού εξοπλισμού παστερίωσης HTST, είτε πρόκειται για πιλοτική εγκατάσταση είτε για εμπορική κλίμακα.

4.3 Ικανότητα παθογόνων βακτηρίων να επιβιώσουν στην παστερίωση

Οι μελέτες αντοχής στη θερμότητα που διεξήχθησαν με τη χρήση είτε ενός πιλοτικού εξοπλισμού HTST σε εργοστάσιο ή / και σε εμπορική κλίμακα, μαζί με πρόσθετα δεδομένα από μελέτες που χρησιμοποίησαν διάφορες εργαστηριακές τεχνικές, επιβεβαίωσαν ότι οι βλαστικές μορφές 11 από τα 18 παθογόνα είδη που υποβλήθηκαν σε έλεγχο καταστρέφονται και στην εξεταστέα «παρτίδα» στους 63 °C για 30 min και κατά την HTST, στους 72 °C για 15 sec διαδικασία παστερίωσης, με εύλογο περιθώριο ασφαλείας. Τα είδη που μελετήθηκαν ήταν:

- *Brucella abortus*
- *Campylobacter jejuni*
- *Campylobacter coli*
- *Coxiella burnetii*
- *Escherichia coli* (0157: H7)
- *Listeria monocytogenes*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycobacterium bovis*
- Ορότυποι *Salmonella enterica*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Yersinia enterocolitica*

Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι τα δεδομένα ανθεκτικότητας στη θερμότητα για αρκετά από τα παραπάνω παθογόνα είναι αρκετά παρωχημένα. Επιπλέον, τα διαθέσιμα στοιχεία για τον *Streptococcus pyogenes* είναι φτωχά.

Επιπλέον ειδική μνεία για τα κάτωθι παθογόνα βακτήρια είναι απαραίτητη:

Mycobacterium paratuberculosis. Η αντίσταση στην θερμική επεξεργασία αυτού του οργανισμού έχει υποβληθεί σε εκτεταμένη μελέτη κατά τη διάρκεια της τελευταίας εικοσαετίας, χρησιμοποιώντας διάφορες εργαστηριακές τεχνικές και εξοπλισμό πειραματικής κλίμακας HTST. Για διάφορους λόγους, η απόκτηση οριστικών δεδομένων αντοχής στη θερμότητα για τον οργανισμό αυτό αποδείχθηκε δύσκολη (Sung and Collins 1998, Rowe et al 2000). Ενώ φαίνεται να είναι άφθονες οι ενδείξεις ότι ο οργανισμός αυτός καταστρέφεται με παστερίωση κατά παρτίδες, μελέτες σχετικά με την ικανότητα του *M. paratuberculosis* για επιβίωση στη θέρμανση στους 72 °C για 15 sec, ακόμη και με εξοπλισμό HTST πιλοτικής κλίμακας, έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα (Gao et al 2002). Ωστόσο, οι πιο πρόσφατες, καλά ελεγχόμενες μελέτες έχουν δείξει ότι επιτυγχάνεται μια ελάχιστη μείωση κατά 4-log₁₀ κατά τη διάρκεια HTST παστερίωσης. Λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των *M. paratuberculosis* που ενδέχεται να απαντά στο γάλα, αυτό το επίπεδο θανάτου παρέχει στην πραγματικότητα ένα λογικό περιθώριο ασφάλειας για τον καταναλωτή. Γενικότερα όμως, έχουν αναφερθεί μειώσεις πληθυσμού της τάξεως των 6-7 D-value (D). Το γεγονός ότι είναι απαραίτητο για λειτουργικούς λόγους η λειτουργία του εξοπλισμού HTST σε θερμοκρασίες ελαφρώς υψηλότερες των 72 °C - εκτός από οποιαδήποτε απόφαση χρήσης υψηλότερων θερμοκρασιών για άλλους λόγους - παρέχει ένα πρόσθετο περιθώριο ασφάλειας. Ένα θεμελιώδες ερώτημα σχετικά με το *M. paratuberculosis*, το οποίο μέχρι τώρα παραμένει αναπάντητο, είναι αν ο οργανισμός είναι στην πραγματικότητα ανθρώπινο παθογόνο ή αν η συσχέτισή του με τη νόσο του Crohn είναι απλώς τυχαία (Mcnees et al 2015). Εάν οι μελέτες αποδείξουν τελικά ότι δεν υπάρχει αιτιώδης συνάφεια μεταξύ του *M. paratuberculosis* και της νόσου του Crohn, οι ανησυχίες ότι αυτός ο οργανισμός θα μπορούσε να επιβιώσει στην παστερίωση του HTST θα αποδειχθούν αβάσιμες.

Bacillus cereus. Αν και υπάρχουν περιορισμένα διαθέσιμα δεδομένα ειδικά για την ανθεκτικότητα στη θερμότητα της βλαστικής μορφής αυτού του οργανισμού και κανένα δεδομένο σε σχέση με εμπορικό εξοπλισμό HTST, είναι γενικά αποδεκτό ότι τα βλαστικά κύτταρα καταστρέφονται εύκολα τόσο από παστερίωση «παρτίδας» όσο και από παστερίωση HTST. Υπάρχουν μελέτες όμως που δείχνουν ότι οι σπόροι του *Bacillus cereus* είναι πολύ ανθεκτικοί στην θερμότητα και επιβιώνουν εύκολα με οποιεσδήποτε θερμικές επεξεργασίες στο κανονικό εύρος παστερίωσης. Η θερμική επεξεργασία παστερίωσης είναι επαρκής για την ενεργοποίηση των σπόρων ταχείας βλάστησης του *B.*

Cereus, αλλά όχι των σπορίων βραδείας βλάστησης. Παρόμοια, η παστερίωση αδρανοποιεί τις διαρροιαγόνες τοξίνες που παράγονται από τον *B. cereus*, αλλά όχι την εμετική τοξίνη.

***Brucella melitensis*.** Δεν εντοπίστηκαν οριστικά στοιχεία σχετικά με την αντίσταση του οργανισμού στη θερμότητα. Εντούτοις, οι γενικές δηλώσεις από αρμόδιους φορείς δείχνουν ότι ο οργανισμός καταστρέφεται με παστερίωση.

***Enterobacter sakazakii*.** Αν και τα δεδομένα είναι κάπως μεταβλητά και τα δεδομένα που χρησιμοποιούν τον εμπορικό εξοπλισμό HTST λείπουν, η συναινετική άποψη είναι ότι η θερμική αντοχή αυτού του οργανισμού εμπίπτει στα περιθώρια ασφαλείας της εμπορικής παστερίωσης. Η παρουσία του σε παστεριωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα διαπιστώθηκε ότι οφείλεται στην εκ νέου μόλυνση του παστεριωμένου προϊόντος μετά το στάδιο παστερίωσης.

***Staphylococcus aureus* (Χρυσίζων σταφυλόκοκκος).** Αν και ο οργανισμός αυτός έχει σχετικά υψηλή αντοχή στη θερμότητα για ένα μεσόφιλο μη σποριογόνο βακτήριο και παρά το γεγονός ότι τα δεδομένα που εκμαιεύονται από τον εμπορικό εξοπλισμό HTST δεν επαρκούν, υπάρχουν πολλές αποδείξεις από εργαστηριακές μελέτες ότι καταστρέφεται τόσο από τις θερμικές επεξεργασίες παρτίδας όσο και από την παστερίωση HTST με ευρύ περιθώριο ασφαλείας. Ωστόσο, η θερμική σταθερότητα των εντεροτοξινών που παράγονται από το *S. aureus* υπερβαίνει κατά πολύ εκείνη των βλαστικών κυττάρων του και εύκολα επιβιώνει την παστερίωση με ευρύ περιθώριο.

***Streptococcus agalactiae*.** Εντοπίστηκε μόνο μία αναφορά σχετικά με την αντίσταση στη θερμότητα του *S. agalactiae*. Αυτό έδειξε - υπό σχετικά απλές πειραματικές συνθήκες - ότι ο οργανισμός αδρανοποιήθηκε σε απροσδιόριστα επίπεδα πληθυσμού στην κρέμα με παστερίωση παρτίδας. Η ανεπάρκεια των πειραματικών δεδομένων σχετικά με την αντοχή στη θερμότητα αυτού του οργανισμού είναι αξιοσημείωτη, δεδομένου ότι αποτελεί κοινή αιτία της μαστίτιδας των βοοειδών και μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο, ιδιαίτερα στις γυναίκες, που πίνουν νωπό γάλα.

***Streptococcus zooepidemicus*.** Δεν βρέθηκε ούτε μια αναφορά για την αντίσταση στη θερμότητα του *S. zooepidemicus*. Αυτό είναι επίσης αξιοσημείωτο, δεδομένου ότι η

μόλυνση στον άνθρωπο από αυτόν τον οργανισμό μπορεί συνήθως να εντοπιστεί σε μια πηγή ζωικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένης της κατάποσης μη παστεριωμένου γάλακτος και τυριού.

4.4 Επιδημιολογικά στοιχεία σχετικά με τις εστίες νόσησης που συνδέονται με την κατανάλωση παστεριωμένου γάλακτος

Υπάρχει ένα σημαντικό μέρος, κυρίως ανεπίσημων αποδείξεων, σχετικά με τα οφέλη της παστερίωσης του γάλακτος για τη δημόσια υγεία, ιδίως κατά το πρώτο μισό του περασμένου αιώνα, το οποίο οδήγησε στην τελική αποδοχή της διαδικασίας της παστερίωσης ως υποχρεωτικού μέτρου δημόσιας υγείας σε πολλές χώρες.

Δεν υπάρχουν σε παγκόσμιο επίπεδο επίσημες τεκμηριωμένες αναφορές για τυχόν εκδηλώσεις γαστρεντερικών ασθενειών λόγω της κατανάλωσης παστεριωμένου γάλακτος. Ωστόσο, σε διάφορες χώρες έχουν εκδηλωθεί πολυάριθμα κρούσματα εντερικής μόλυνσης τα τελευταία χρόνια λόγω της κατανάλωσης μη παστεριωμένου γάλακτος.

Μία έξαρση που περιλάμβανε 50 κρούσματα κρυπτοσποριδίου μεταξύ μαθητών στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1995, εντοπίστηκε ότι οφείλονταν στην κατανάλωση «παστεριωμένου» γάλακτος από τοπικό αγρόκτημα. Κατά την έρευνα, ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι ο εξοπλισμός παστερίωσης του αγροκτήματος ήταν ελαττωματικός και ότι, ως εκ τούτου, τα παιδιά είχαν καταναλώσει ανεπαρκώς παστεριωμένο γάλα (Putignani and Menichella 2010).

Δύο επιδημίες καμπυλοβακτηρίωσης αναφέρθηκαν στην Πολιτεία της Βικτώρια στην Αυστραλία μεταξύ μαθητών που είχαν επισκεφθεί τοπικές φάρμες. Το πρώτο κρούσμα έλαβε χώρα το 2000 συσχετίζοντας 25 κρούσματα. Το δεύτερο κρούσμα έγινε το 2003 συσχετίζοντας 13 περιστατικά. Βάσει των επιδημιολογικών πληροφοριών, θεωρήθηκε ότι και τα δύο κρούσματα σχετίζονταν με την κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος. Όμως, καμία μικροβιολογική εξέταση δεν πραγματοποιήθηκε για να ταυτοποιήσει την πηγή της μόλυνσης (Modi et al 2015).

Στην Αυστραλία το 1999 καταγράφηκαν 12 περιστατικά με μολυσμένο μη παστεριωμένο γάλα, στο οποίο ταυτοποιήθηκε η παρουσία του βακτηρίου *Salmonella typhimurium*. Το 2000 αναφέρθηκαν 12 περιστατικά άμεσα συνδεδεμένα με μη παστεριωμένο γάλα στα οποία εντοπίστηκαν ωκύστες του κρυπτοσποριδίου. Ένα ακόμη περιστατικό στο Κουίνσλαντ της Αυστραλίας το 2001 με 8 αρρώστους από κρυπτοσπορίδιο αποδόθηκε στην κατανάλωση εμπορικού ακατάλληλου αγελαδινού τυριού

που δεν είχε υποστεί παστερίωση. Από αναφορές αμερικανικών και αγγλικών βιβλιογραφιών γίνεται λόγος για πολλά κρούσματα σαλμονέλλωσης, καμπυλοβακτηρίωσης και λιστερίωσης ανά διαστήματα στις χώρες αυτές και συγκεκριμένα:

Ηνωμένο Βασίλειο – κρούσματα από κατανάλωση νωπού γάλακτος:

1983-84, 27 περιστατικά από σαλμονέλλωση, καμπυλοβακτηρίωση και γερσινίωση

1992-94, 3 περιστατικά καμπυλοβακτηρίωσης

1996, 1 περιστατικό *E. Coli* O157

Η.Π.Α. – κρούσματα από κατανάλωση νωπού γάλακτος:

1981-1990, 20 περιστατικά καμπυλοβακτηρίωσης

1992-1993, 1 περιστατικό *E. Coli* O157

2003, 1 περιστατικό καμπυλοβακτηρίωσης

Η.Π.Α. – κρούσματα από κατανάλωση τυριού από μη παστεριωμένο γάλα:

1997, 1 περιστατικό *Salmonella Typhimurium*

2001, 1 περιστατικό λιστερίωσης (Cancino-Padilla et al 2017, Keba et al 2020)

Η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε συσκευασίες εμπορικού παστεριωμένου γάλακτος από μόνη της είναι ανεπαρκής απόδειξη ότι οι οργανισμοί είναι ανθεκτικοί στη διαδικασία της παστερίωσης. Υπάρχουν καλά τεκμηριωμένες περιπτώσεις στις οποίες έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία παθογόνων στελεχών στο παστεριωμένο γάλα οφείλεται σε ανεπαρκή παστερίωση (π.χ. ελαττωματικό εξοπλισμό ή ανεπαρκή έλεγχο της διαδικασίας) ή στην δευτερογενή μόλυνση του γάλακτος μετά το στάδιο παστερίωσης στη γραμμή επεξεργασίας (π.χ. αναποτελεσματική απολύμανση του εξοπλισμού).

4.5 Συνολικά συμπεράσματα όσον αφορά τις παραδοσιακές επεξεργασίες παστερίωσης

Συμπεραίνεται ότι οι καταναλωτές παστεριωμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων σε παγκόσμιο επίπεδο μπορούν να είναι σίγουροι ότι η παστερίωση εξακολουθεί να αποτελεί ένα πολύ αποτελεσματικό μέτρο δημόσιας υγείας. Τρεις συμπληρωματικές παρατηρήσεις επιτρέπουν το συμπέρασμα αυτό:

(α) Ισχυρά δεδομένα ανθεκτικότητας στη θερμότητα που δείχνουν ότι τα βλαστικά κύτταρα των σημαντικότερων παθογόνων παραγόντων που προέρχονται από το γάλα

καταστρέφονται με παστερίωση, με εύλογο περιθώριο ασφαλείας [αν και αναγνωρίζεται ότι εξακολουθούν να υπάρχουν ορισμένα κενά στα δεδομένα για ορισμένους οργανισμούς και ότι υπάρχουν και άλλες μορφές (π.χ. σπόρια) ή προϊόντα (π.χ. τοξίνες) ορισμένων ειδών που μπορούν να αντέξουν την παστερίωση].

(β) Με λίγες εξαιρέσεις, (οι οποίες σχετίζονται περισσότερο με τον έλεγχο της διαδικασίας ή με την ερμηνεία του τι ισοδυναμεί με ισοδύναμη διαδικασία παστερίωσης) η παστερίωση του γάλακτος και των υγρών γαλακτοκομικών προϊόντων πληροί τα ελάχιστα πρότυπα χρόνου και θερμοκρασίας που καθορίζονται στους Κώδικες Τροφίμων παγκοσμίως. Σε πολλές περιπτώσεις, το προϊόν θερμαίνεται σε θερμοκρασία ή / και χρόνο που συχνά υπερβαίνει τα προβλεπόμενα ελάχιστα.

γ) Έλλειψη επιδημιολογικών δεδομένων που δείχνουν ότι τα παστεριωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν εμπλακεί σε ενδεχόμενες εστίες γαστρεντερικών ασθενειών τα τελευταία χρόνια, ενώ, αντίθετα, αυτές οι εστίες εξακολουθούν να συνδέονται με την κατανάλωση νωπού γάλακτος τόσο στον αναπτυγμένο κόσμο όσο και σε άλλες, αναπτυσσόμενες χώρες .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.

ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (ALP): ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΥΤΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΙΕΙΝΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ (Εικόνα 13)



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). Τρισδιάστατη αναπαράσταση της δομής της ALP του βακτηρίου *Escherichia coli* (ECAP) με δεσμευμένο Pi (PDBcode 1ED8). Το μονομερές A απεικονίζεται με μπλε χρώμα και το μονομερές B με κόκκινο. Οι γαλάζιες σφαίρες αντιπροσωπεύουν τα ιόντα ψευδαργύρου και οι πράσινες τα ιόντα μαγνησίου (Kantrowitz 2011).

Οι συνήθειες πρακτικές για την έμμεση αξιολόγηση της κατάστασης παστερίωσης των γαλακτοκομικών προϊόντων βασίζονται κυρίως στην κινητική θερμικής απενεργοποίησης του ενδογενούς ενζύμου γάλακτος, της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). Η αξιολόγηση αυτή παρέχει ένα ανεκτίμητο, αν όχι απαραίτητο, εργαλείο τόσο για ρυθμιστικούς όσο και για εσωτερικούς ελέγχους και επικύρωση διαδικασιών. Η ενδογενής ALP στο γάλα εμφανίζει ελαφρώς υψηλότερη αντοχή στη θερμότητα από την παθογόνο μικροχλωρίδα στην οποία βασίζονται οι απαιτήσεις παστερίωσης και θερμοκρασίας. Ως εκ τούτου, η δραστηριότητα ALP αναγνωρίζεται και γίνεται αποδεκτή ως μέθοδος επιλογής για την ταχεία επικύρωση της παστερίωσης του γαλακτοκομικού προϊόντος.

Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα ευπαθή, δυνητικά επικίνδυνα τρόφιμα, η μεγάλη πλειοψηφία των γαλακτοκομικών προϊόντων υποβάλλονται σε οριστική θερμική επεξεργασία (δηλαδή παστερίωση). Δεδομένης της πολυπλοκότητας του σύγχρονου εξοπλισμού επεξεργασίας γάλακτος, των παγκόσμιων συστημάτων διανομής και των αυξανόμενων κανονιστικών και βιομηχανικών απαιτήσεων, η δοκιμή αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) υιοθετήθηκε από πολλές χώρες ως πρότυπη δοκιμασία για ταχεία επικύρωση της διαδικασίας παστερίωσης γάλακτος. Η προϋπόθεση της δοκιμής ALP βασίζεται στα χαρακτηριστικά θερμικής απενεργοποίησης του ενζύμου ALP που είναι ενδογενές στο γάλα. Εν ολίγοις, η ALP είναι ελαφρώς πιο ανθεκτική στη θερμική απενεργοποίηση από ότι τα βακτηριακά παθογόνα στόχοι (δηλαδή το *Coxiella burnetii* και το *Mycobacterium tuberculosis*, τα πιο ανθεκτικά στη θερμότητα βακτήρια που υπάρχουν

στο γάλα). Έτσι, εάν οι δραστηριότητες της ALP μειωθούν σημαντικά, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι ο πληθυσμός των βακτηριακών παθογόνων στόχων μειώθηκε τουλάχιστον παρόμοια και ότι πληρούνται οι νομικές θερμικές απαιτήσεις για παστερίωση. Η ανίχνευση αυξημένων επιπέδων δραστηριότητας ALP ερμηνεύεται κυρίως ως ένδειξη ότι είτε το γάλα δεν ήταν επαρκώς παστεριωμένο είτε μολύνθηκε με νοπό γάλα μετά τη θερμική επεξεργασία της παστεριοποίησης (Harding 1991). Άλλες ερμηνείες αυξημένων δραστηριοτήτων της ALP σε τελικά γαλακτοκομικά προϊόντα περιλαμβάνουν την παρουσία βακτηριακής ALP ή τη βιοχημική επανενεργοποίηση του ενζύμου ALP. Η μόλυνση του παστεριωμένου προϊόντος με το ακατέργαστο προϊόν έχει συμβεί ιστορικά ως αποτέλεσμα της ανεπάρκειας ή της ελλειπούς συντήρησης του σωστού εξοπλισμού παστερίωσης, του σφάλματος διαχείρισης από το προσωπικό ή της κακοδιαχείρισης μέσω της διάθεσης ακατέργαστου και τελικού προϊόντος.

Αν και η δοκιμασία ALP χρησιμοποιείται ευρέως και αναγνωρίζεται ως η καταλληλότερη μέθοδος για την επαλήθευση της παστερίωσης του γάλακτος, η συνετή εφαρμογή των αναλύσεων που βασίζονται σε ALP πρέπει να βασίζεται στην κατανόηση της ανάλυσης και των περιορισμών της. Αρκετά διαφορετικά πρότυπα πρωτόκολλα υπάρχουν για τη διεξαγωγή δοκιμασιών ALP, το καθένα βασίζεται σε διαφορετικές μεθόδους παρασκευής δειγμάτων ή υπόστρωμα ALP. Το καθένα από αυτά έχει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς του, για την επαλήθευση της διαδικασίας παστερίωσης γαλακτοκομικών προϊόντων.

5.1 ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ

Η αλκαλική φωσφατάση είναι μια πρωτεΐνη που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Suzuki et al (1907). Απαντά σε αφθονία στη φύση και βρίσκεται σε πολλούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος, όπως το ήπαρ, τα νεφρά, τα οστά και τα κύτταρα του αίματος. Βρίσκεται στο γάλα (Shakeel-Ur-Rehman et al 2011) και άλλα σωματικά υγρά πολλών οργανισμών σε διαφορετικά επίπεδα. Η αλκαλική φωσφατάση (EC 3.1.3.1) είναι μια μεμβρανοδεσμευτική γλυκοπρωτεΐνη με σιαλικό οξύ ως μονάδα σακχάρου. Είναι ένζυμο φωσφομονοεστεράσης που καταλύει την υδρόλυση μονοεστέρων φωσφορικού οξέος (σε αλκαλικό pH), αποδίδοντας φωσφορικά άλατα και την αντίστοιχη αλκοόλη. Η αφθονία στη φύση και η σπουδαιότητα αυτού του ενζύμου σε βιολογικά συστήματα έχει κάνει τις αξιολογήσεις δραστηριότητας ALP μία από τις πιο συχνά διεξαγόμενες ενζυματικές δοκιμές (Miggiano et al 1983).

Η αλκαλική φωσφατάση είναι ένα από περισσότερα από εξήντα ενδογενή ένζυμα σε ακατέργαστο βόειο γάλα (Schlimme et al 1998). Η δομή της ALP από το βακτήριο *Escherichia coli* έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Ωστόσο, η ALP των θηλαστικών είναι γνωστό ότι έχει χαμηλή ταυτοσημία αλληλουχίας Αδενίνης - Αδενίνης (AA) με ALP από *E. coli* (Bortolato et al 2002). Η καθαρή βόεια ALP βρέθηκε να έχει μοριακή μάζα 187 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο που κυμαίνεται από pH 5,4 έως 6,0 (Vega-Warner et al 2000). Έχει μέγιστη δραστικότητα στην περιοχή pH μεταξύ 9,65 και 10,1 στους 37 °C. Στην ενεργό μορφή του, το μόριο της βόειας ALP σχηματίζει σύμπλοκα με άτομα ψευδαργύρου που προσδίδουν δομική ακεραιότητα και λειτουργικές ιδιότητες. Η παρουσία μεταλλικών ιόντων πιστεύεται επίσης ότι έχει ένα ρόλο στην ικανότητα της βόειας ALP να ανακτήσει την ενζυμική δραστικότητα μετά από θερμική αδρανοποίηση (Wright and Tramer 1956). Η ALP γάλακτος βοοειδών αναφέρθηκε ότι είναι αδιάλυτη στο λίπος και ανιχνεύεται στη διασταύρωση λιπιδίου-νερού στο γάλα. Η αλκαλική φωσφατάση συσχετίζεται με τη μεμβράνη σφαιρικού λίπους γάλακτος - Milk Fat Globule Membrane (MFGM) στο νωπό γάλα (Kosikowski 1988), η οποία μπορεί να είναι αντιληπτή όταν τα συμπυκνωμένα ή κλασματικά γαλακτοκομικά προϊόντα, εμπλουτισμένα σε Milk Fat Globule Membrane (MFGM), παστεριώνονται. Η φυλή αγελάδων, ο όγκος παραγόμενου γάλακτος και το στάδιο γαλουχίας (Haab and Smith 1956, Murthy et al 1992) μπορούν να επηρεάσουν τη συγκέντρωση της ALP στο γάλα. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το επίπεδο της ALP στο συγκεντρωμένο γάλα είναι σχετικά σταθερό (Burgwald 1939). Με δεδομένες τις προκλήσεις με την ALP ως ένζυμο δείκτη, μερικές μελέτες έχουν εξετάσει και άλλα πιθανά ένζυμα όπως η απαμινάση της αδενοσίνης (EC 3.5.4.4) (Martin et al 1998, Schlimme et al 1998) και γ-γλουταμυλοτρανσφεράση EC 2.3.2.2) (dos Anjos et al 1998).

Η σημασία της ALP των βοοειδών στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων σχετίζεται με τις θερμικές ιδιότητες απενεργοποίησης επειδή είναι ελαφρώς πιο ανθεκτική στη θερμική επεξεργασία από τα βακτηριακά παθογόνα, στα οποία βασίζονται οι επικυρωμένες διεργασίες παστερίωσης. Η θερμική απενεργοποίηση της ALP συσχετίζεται καλά με το θερμικά προκαλούμενο βακτηριακό θάνατο (van Bever 1943). Οι συσχετισμοί αυτοί έχουν καθιερώσει και ενισχύσει την υπόθεση ότι η δοκιμασία ALP θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο για την επαλήθευση της παστερίωσης (Sanders and Sager 1948). Πιο πρόσφατες μελέτες βρήκαν επίσης παρόμοιους συσχετισμούς συγκρίνοντας τις τιμές απενεργοποίησης των *Salmonella senftenberg* και *Listeria monocytogenes* (Eckner 1992). Η θερμική απενεργοποίηση της ALP έχει βρεθεί ότι ακολουθεί την κινητική

πρώτης τάξης και το μέσο σημείο μετουσίωσης για την ALP έχει ληφθεί στους 56 °C για θέρμανση 30 min (Levieux et al 2007). Η ενδογενής ALP γάλακτος μπορεί επίσης να απενεργοποιηθεί με επεξεργασία υψηλής πίεσης στην κλίμακα 400 έως 800 MPa και σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 5 έως 40 °C (Rademacher and Hinrichs 2006). Έχει αναφερθεί ότι η αδρανοποίηση ALP που προκαλείται από ομογενοποίηση υψηλής πίεσης οφείλεται σε μηχανικές δυνάμεις όπως διάτμηση, σπηλαίωση και κρούση (Picart et al 2006). Η παλμική επεξεργασία ηλεκτρικού πεδίου μπορεί να επηρεάσει την αδρανοποίηση τόσο της βόειας όσο και της μικροβιακής ALP που υπάρχει στο ακατέργαστο αποβουτυρωμένο γάλα (Shamsi et al 2008). Επίσης, προγνωστικές εξισώσεις βασισμένες στην απενεργοποίηση της ALP σε ένα παστεριωτή με μέθοδο παστερίωσης HTST έχουν αναπτυχθεί, για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα των εμπορικών διαδικασιών παστερίωσης (McKellar et al 1994). Ως εκ τούτου, η αξιολόγηση της δραστηριότητας ALP χρησιμοποιείται ως ένας γρήγορος, έμμεσος δείκτης της παστεριωτικής κατάστασης στα τελικά γαλακτοκομικά προϊόντα.

5.2 Περιορισμός των αναλύσεων ALP

Η δοκιμασία ALP επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η σύνθεση του προϊόντος που εξετάζεται, η ικανότητα της ALP να ανακτήσει τη δραστηριότητά της και η παρουσία μικροβιακής ALP.

5.2.1 Συνθετικοί παράγοντες.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η σύνθεση του γάλακτος ή του γαλακτοκομικού προϊόντος μπορεί να επηρεάσει τις δοκιμασίες ALP. Οι Painter και Bradley (1997) πραγματοποίησαν προσδιορισμούς ALP σε γάλα και κρέμα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διάφορες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας για να προσδιοριστεί η σταθερότητα της ALP χρησιμοποιώντας μια φθοριμετρική μέθοδο. Αυτή η μελέτη κατέδειξε ότι τα αυξανόμενα επίπεδα λίπους είχαν ως αποτέλεσμα αυξημένη δραστηριότητα της ALP. Η ALP στο γάλα αναφέρεται ότι σχετίζεται με το MFGM και συμπυκνώνεται στη φάση της κρέμας (Kosikowski 1988). Τα προϊόντα με αυξημένα επίπεδα λίπους γάλακτος μπορούν να έχουν υψηλότερες αρχικές τιμές ALP. Οι υπολειμματικές τιμές ALP στο μη λιπαρό γάλα αναφέρονται περίπου 50% χαμηλότερες από το πλήρες γάλα όταν παστεριώνονται σε ελάχιστες απαιτήσεις χρόνου και θερμοκρασίας HTST (Painter and

Bradley 1997). Στη μελέτη των Claeys et al (2002) αναφέρθηκε ότι αν και το πλήρες γάλα παρουσιάζει υψηλότερες αρχικές δραστηριότητες ALP από το μη λιπαρό γάλα, η περιεκτικότητα σε λιπαρά μπορεί να μην είναι ο μόνος παράγοντας που επηρεάζει το αποτέλεσμα της δοκιμής ALP παστεριωμένου γάλακτος.

5.2.2 Χημικές ενώσεις και συνθήκες παρεμβολής

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γάλα φράουλας, αποτελούν προφανή πρόκληση παρεμβολής με χρωματομετρικές αναλύσεις ALP. Τα άλλα μη χρωματισμένα πρόσθετα τροφίμων με αντιδρώσες φαινολικές ομάδες, όπως η βανιλίνη (όταν οξειδώνεται σε βανιλικό οξύ), το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ και το σαλικυλικό οξύ, μπορούν να παρεμποδίσουν το υπόστρωμα της ανάλυσης ALP ώστε να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Murthy et al 1992). Τα υπολείμματα αντιβιοτικών της οξυτετρακυκλίνης και της πενικιλίνης με φαινορικά τμήματα έχουν δείξει ότι δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα με χρωματομετρικές δοκιμές (Manolkidis et al 1971). Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν βρεθεί με φυτοφάρμακα που περιέχουν πολυχλωριωμένα διφαινύλια, λόγω της αντιδραστικότητας των φαινυλομάδων (Kumar et al 1973). Η δραστηριότητα αλκαλικής φωσφατάσης έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλεται από φλαβονοειδή, σακχαρίτες (Kuzuya et al 1982) και ασκορβικό οξύ (Miggiano et al 1983). Ορισμένες πολυφαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο κακάο επίσης πιστεύεται ότι έχουν ανασταλτική επίδραση στην ALP (Murthy et al 1992). Το χλωριούχο νάτριο (0,25 M) φαίνεται ότι μειώνει τη θερμική σταθερότητα της ALP κατά περίπου 50% (Linden 1979). Αντίθετα, η αυξημένη συγκέντρωση λακτόζης αυξάνει τη θερμική σταθερότητα της ALP (Sanders et al 1954).

Το ένζυμο ALP μπορεί να υποστεί μια μη αναστρέψιμη απώλεια δραστηριότητας σε όξινες τιμές pH τυπικές για καλλιεργημένο γάλα και γιαούρτι (Murthy et al 1992). Πρόσφατα, σε μια άλλη μελέτη (Ma et al 2001), το διοξείδιο του άνθρακα που ενσωματώθηκε στα γαλακτοκομικά προϊόντα για σκοπούς αποθήκευσης δεν είχε σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα ALP. Γενικά απαιτείται η χρήση κατάλληλων ελέγχων για παρεμβαλλόμενες ουσίες, μαζί με αρνητικούς και θετικούς ελέγχους για τέτοια εμπλουτισμένα προϊόντα.

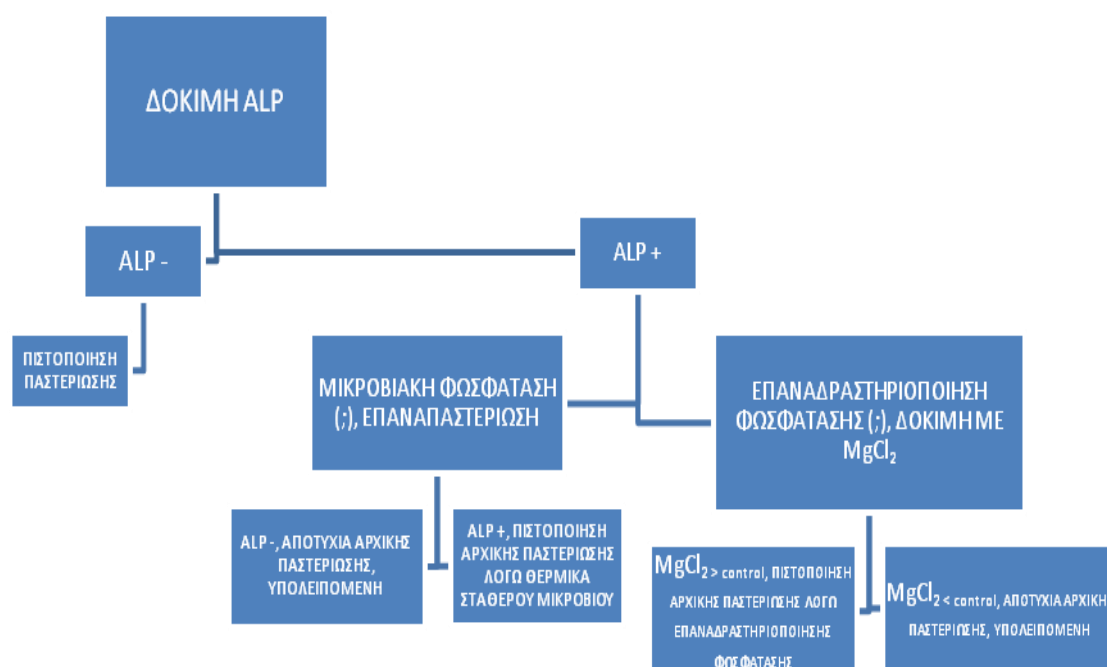
5.2.3 Μικροβιακή αλκαλική φωσφατάση.

Η αλκαλική φωσφατάση παράγεται από πολλά βακτηριακά στελέχη και, σε πολλές περιπτώσεις, παρουσιάζει υψηλότερη θερμική σταθερότητα από την βόεια ALP, αυξάνοντας πιθανώς την εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Μερικές από τις μέχρι σήμερα αναφορές υποδεικνύουν ότι ορισμένα βακτηριακά κύτταρα παράγουν θερμικά ασταθή ALP, καθιστώντας δύσκολη τη διαφοροποίηση από την υπολειπόμενη ALP βοοειδών (Knight and Fryer 1989). Έτσι, η Αμερικανική Ένωση Δημόσιας Υγείας συνιστά την επαναπαστερίωση οποιουδήποτε θετικού δείγματος. Εάν η δραστηριότητα ALP του επαναπαστεριωμένου δείγματος δεν μειωθεί αισθητά, βγαίνει το συμπέρασμα ότι το αρχικό αποτέλεσμα της ανάλυσης ALP οφειλόταν στην παρουσία σταθεροποιημένης στη θερμότητα μικροβιακής ALP. Οι Murthy και Kaylor (1990) πρότειναν ότι, επειδή τα μικρόβια μπορούν να παράγουν τόσο θερμικά ασταθή και θερμικά σταθερή ALP, η διαφοροποίηση της βόειας και μικροβιακής ALP γίνεται ιδιαίτερα προβληματική. Οι Murthy και Kaylor (1990) συνιστούν τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε αγαρόζη για διαφοροποίηση μεταξύ μικροβιακής και βόειας ALP. Οι ψυχοτροφικές μετρήσεις στο γάλα πριν από την παστερίωση με πληθυσμό μικροβίων άνω των $1,2 \times 10^7$ cfu / mL μπορεί να έχουν επαρκή μικροβιακή ALP για να προκαλέσουν θετική δοκιμή ALP (Knight and Fryer 1989). Ωστόσο, οι τρέχουσες πρακτικές που χρησιμοποιούνται για τη διάκριση μεταξύ αυτών των δραστηριοτήτων βασίζονται στις χαρακτηριστικές ατομικές πληροφορίες, θερμοκρασία ενεργοποίησης της ενεργοποιημένης και μικροβιακής ALP (Διάγραμμα 1). Στη μελέτη των Rosenthal et al (1996) αναφέρεται ότι τα τυριά που εμβολιάστηκαν με το στέλεχος *Penicillium roqueforti* έχουν πλήρη δραστηριότητα θερμικής ασταθούς ALP.

Μη βόεια προϊόντα

Ενώ οι περισσότερες μελέτες για την ανίχνευση ALP έχουν γίνει στο αγελαδινό γάλα, λίγοι έχουν επικεντρωθεί στο μη βόειο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα αυτών (Harding and Garry 2005, Moatsou 2010). Γενικά, το γάλα κατσίκας έχει χαμηλότερες δραστηριότητες ALP σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα (Mathur 1974, Williams 1986). Η δραστηριότητα ALP στο πρόβειο γάλα έχει αναφερθεί ότι είναι 2 ή 3 φορές υψηλότερη από εκείνη του αγελαδινού γάλακτος και αυξάνεται καθ' όλη τη διάρκεια της γαλουχίας (Scintu et al 2000), από περίπου 8000 έως 17.000 μg φαινόλης/ mL (Klotz et al 2008). Οι Raynal-Ljutovaca et al (2007) ανέφεραν σημαντικές διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων ALP

μεταξύ ειδών, φυλών σε είδη και μεμονωμένα ζώα. Οι κλίμακες συγκεντρώσεων ALP στο γάλα κατσίκας, προβάτου και αγελάδας που βρέθηκαν από τους συγγραφείς ήταν 115 έως 1.300 μg φαινόλης / mL , 8.300 έως 17.300 μg φαινόλης / mL και 1.800 έως 4.750 μg φαινόλης / mL, και προφανώς δεν σχετίζονταν με την περιεκτικότητα σε λίπος των δειγμάτων γάλακτος.



Διάγραμμα 1: Διάκριση μεταξύ δραστηριοτήτων βασίζονται στις χαρακτηριστικές ατομικές πληροφορίες, θερμοκρασία ενεργοποίησης της ενεργοποιημένης και μικροβιακής ALP.

Κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας των γαλακτοκομικών προϊόντων, η αύξηση της δραστηριότητας ALP στα γάλατα των αιγών και των προβάτων μειώθηκε σε σύγκριση με τη δραστηριότητα ALP στο αγελαδινό γάλα (Vamvakaki et al 2006). Ορισμένες αναφορές υποδεικνύουν επίσης ότι η ALP στο πρόβειο γάλα είναι ελαφρώς πιο ευαίσθητη σε θερμική μετουσίωση από ότι στο αγελαδινό γάλα (Anifantakis and Rosakis 1983). Ως εκ τούτου, μερικές χρωματομετρικές μέθοδοι έχουν σημαντικά μειωμένη ευαισθησία και έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικό ποσοστό αποτυχίας ακόμη και με 0,8% προστιθέμενα επίπεδα νωπού γάλακτος σε παστεριωμένο γάλα. Οι Williams και Nottingham (1990) τροποποίησαν τη διαδικασία προσδιορισμού Aschaffenburg και Mullen αυξάνοντας τον όγκο του δείγματος και αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία για

εφαρμογή στο γάλα κατσίκας. Οι τιμές ALP στο γάλα κατσίκας έχουν αναφερθεί ότι ποικίλλουν ευρέως με μικρή ή καθόλου συσχέτιση με το λίπος γάλακτος, το μη λιπαρό στερεό γάλακτος και την απόδοση με ελάχιστη εποχιακή επίδραση (Williams and Nottingham 1990). Ο Barbosa (2005) πρότεινε ότι οι διαφορές στην περιεκτικότητα σε λιπαρά του γίδινου και του πρόβειου γάλακτος που χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για τυρί έχουν επίδραση στην απόδοση των διαθέσιμων, μέχρι σήμερα, δοκιμών ALP. Οι Klotz et al (2008) προσδιόρισαν και συνέκριναν ποσοτικούς προσδιορισμούς, συμπεριλαμβανομένων των χρωματομετρικών και φθοριομετρικών ποσοτικών προσδιορισμών για την ενεργότητα ALP στα γάλατα αιγοπροβάτων, για να διερευνηθεί η επάρκεια των σημερινών προτύπων ALP. Οπότε κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η φθοριομετρική δοκιμασία ήταν πιο ευαίσθητη και επαναλαμβανόμενη σε σύγκριση με τη χρωματομετρική δοκιμασία για την ενεργότητα της ALP σε γάλα αιγών και προβάτων.

Πιο πρόσφατα, οι Sharma et al (2009) ανέφεραν ότι η ενεργοποίηση του ενζύμου ALP στο γάλα κατσίκας ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ό,τι στα γάλατα βοοειδών ή βουβάλων. Δεν διαπίστωσαν σημαντική διαφορά στις ενεργοποιήσεις ALP σε γάλα από βοοειδή και βουβάλια και παρατήρησαν ότι οι ενεργοποιήσεις της ALP συγκεντρώθηκαν σε φάση κρέμας γάλακτος. Οι συγγραφείς ανέφεραν επίσης ότι το μοντέλο θερμικής απενεργοποίησης των μεμονωμένων ενζύμων από τα γάλατα βοοειδών, βουβάλων και αιγών ήταν παρόμοιο.

5.3 Επανενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης.

Επειδή το αποτέλεσμα της ανάλυσης ALP θεωρείται ενδεικτικό της αποτελεσματικότητας της παστερίωσης του γάλακτος, η πιθανότητα λήψης θετικών αποτελεσμάτων λόγω της επαναδραστηριοποίησης ALP, μπορεί επίσης να είναι ένα πρόβλημα κατά τη δοκιμή της δραστηριότητας αυτού του ενζύμου σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι Wright και Tramer (1956) ήταν οι πρώτοι που αναγνώρισαν την επανενεργοποίηση της ALP. Αναφέρουν ότι, το παστεριωμένο γάλα θα μπορούσε να δείξει θετική τη δραστηριότητα της ALP, όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 22 έως 37 °C, ακόμα και όταν ένα αρνητικό αποτέλεσμα ALP λήφθηκε για το ίδιο παστεριωμένο γάλα μετά την επεξεργασία. Η κρέμα που έχει θερμανθεί στους 74 °C με μετέπειτα αποθήκευση σε θερμοκρασίες > 30 °C έχει επίσης δείξει την επανενεργοποίηση της ALP (Lyster and Aschaffenburg 1962). Οι Murthy et al (1976) διεξήγαγαν μια σειρά πειραμάτων για να αποδειχθεί ότι η μέγιστη επανενεργοποίηση της

ALP σε γαλακτοκομικά προϊόντα εμφανίστηκε όταν θερμάνθηκαν στους 104,4 °C, επώαστηκαν στους 34 °C και ρυθμίστηκε το pH στην τιμή 6,5. Επίσης, διαπίστωσαν ότι το νωπό γάλα που υποβλήθηκε σε γρήγορη θέρμανση πάνω από τους 85 °C είναι πιο επιρρεπές σε "επανενεργοποίηση ή επαναπροσδιορισμό" του ενζύμου ALP (Wright and Tramer 1956). Η μεταγενέστερη μελέτη δεν μπορούσε να δημιουργήσει μια συσχέτιση μεταξύ της επανενεργοποίησης, του χρόνου / θερμοκρασίας της παστερίωσης ή του χρόνου αποθήκευσης μετά την επεξεργασία. Επίσης διαπιστώθηκε ότι η τάση για επανενεργοποίηση, κυμαινόταν στο γάλα χωρίς ειδική σχέση με την περιεκτικότητα σε λίπος, το ασκορβικό οξύ ή την περιεκτικότητα σε μεταλλικά ιόντα (Wright and Tramer 1956). Έχει συναχθεί το συμπέρασμα ότι το γάλα που παστεριώνεται σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 71,7 °C είναι πιο επιρρεπές στην επανενεργοποίηση. Σε άλλη μελέτη, η κρέμα που θερμάνθηκε στους 74 °C με μετέπειτα αποθήκευση σε θερμοκρασίες > 30 °C έδειξε επανενεργοποίηση της ALP (Lyster and Aschaffenburg 1962).

Ο ρόλος των μεταλλικών ιόντων (π.χ., οξικού μαγνησίου) στην επανενεργοποίηση της ALP υπήρξε το επίκεντρο αρκετών μελετών (Richardson et al 1964, Kuzuya et al 1982). Τα αναφερόμενα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το Mg^{+2} μαζί με τον Zn^{+2} διεγείρουν την επανενεργοποίηση της δραστηριότητας της ALP, ενώ τα Co^{+2} , Cu^{+2} , EDTA και Sn^{+2} μπορούν να αναστείλουν την επανενεργοποίηση της ALP ανάλογα με την ύπαρξη διαφόρων παραγόντων όπως, η διαθεσιμότητα ελεύθερων ιόντων Ca^{+2} και Mg^{+2} , οι συνθήκες θέρμανσης και αποθήκευσης, η διαθεσιμότητα φωσφορικών αλάτων και οι συνθήκες pH (Sharma and Ganguli 1974, Linden et al 1977, Linden 1979, Murthy et al 1979, Fox and Kelly 2006). Έχει αναφερθεί ότι η διαδικασία επανενεργοποίησης είναι μη αναστρέψιμη στο γάλα που έχει υποστεί κατεργασία με UHT όταν αποθηκεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η ομογενοποίηση πριν από τη θερμική επεξεργασία έχει βρεθεί ότι μειώνει τον ρυθμό επαναδραστηριοποίησης. Σε μεταγενέστερη εργασία, οι Painter και Bradley (1997) διαπίστωσαν ότι τα γάλατα με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά είναι ελαφρώς λιγότερο ευαίσθητα στην επανενεργοποίηση. Μια άλλη μελέτη (Gallusser and Bergner 1981) έδειξε ότι ο ρυθμός επανενεργοποίησης της ALP έχει αντίστροφη σχέση με την περιεκτικότητα σε οξυγόνο. Επίσης, το γάλα UHT με αυξημένο διαθέσιμο οξυγόνο έδειξε μικρότερη ενεργοποίηση. Έχει προταθεί ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, οι ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας αργότερα, οξειδώνονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, αναστέλλοντας έτσι αντιδράσεις διασταυρούμενης σουλφυδρυλικής σύνδεσης, αναγκαίες για τη δομική δραστηριότητα της ALP.

Τα αναλυτικά βήματα για τη διαφοροποίηση μεταξύ υπολειμματικής και επανενεργοποιημένης ALP βασίζονται στην προϋπόθεση ότι η ALP θα επανενεργοποιηθεί (4- έως 10-πλάσια αύξηση της δραστηριότητας) παρουσία αλάτων μαγνησίου (Richardson et al 1964).

Σε μια τέτοια κατάσταση, ένα τελικό παστεριωμένο προϊόν μπορεί να αποδώσει έναν ψευδώς θετικό προσδιορισμό ALP. Κάθε φορά που υποψιαζόμαστε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα της δοκιμής λόγω της επανενεργοποίησης της ALP, ο χρήστης θα πρέπει να προχωρήσει σύμφωνα με τις ακόλουθες οδηγίες: **(1)** Το εν λόγω γάλα χωρίζεται σε 2 δείγματα, και το ένα δείγμα επεξεργάζεται με διάλυμα οξικού μαγνησίου για την προώθηση της επανενεργοποίησης. **(2)** Και τα δύο δείγματα επωάζονται στους 34 °C για 60 min. **(3)** Το δείγμα αραιώνεται 6 φορές και στη συνέχεια. **(4)** Το δείγμα υποβάλλεται σε ποσοτικό προσδιορισμό για δραστηριότητα ALP. Εάν οι μετρήσεις του δείγματος που έχουν υποβληθεί σε κατεργασία με Mg είναι ίσες ή υψηλότερες από το δείγμα ελέγχου, η αρχική ανάλυση ALP θεωρείται ως αποτέλεσμα της επανενεργοποιημένης ALP. Αντίθετα, εάν το δείγμα που υποβλήθηκε σε κατεργασία με Mg εμφανίζει μικρότερη δραστηριότητα από τον έλεγχο, οι τιμές θεωρούνται ότι προκύπτουν από υπολειμματική ALP. Η αποκρυπτογράφηση της διαφοράς μεταξύ της υπολειπόμενης και της επανενεργοποιημένης δραστηριότητας ALP, μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα για το εργοστάσιο και το προσωπικό. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να περιπλέκεται περαιτέρω από την παρουσία μικροβιακής ALP.

Υπό κανονικές συνθήκες ανάλυσης, η μέθοδος ALP έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα εξαιρετικά πολύτιμο εργαλείο για την τακτική αξιολόγηση της επικύρωσης της παστερίωσης γάλακτος, ωστόσο εξακολουθούν να υπάρχουν ορισμένες ανησυχίες. Η επανενεργοποίηση και η μικροβιακή ALP εξακολουθούν να προκαλούν ανησυχίες και ρυθμιστικές δυσκολίες, ειδικά για τα επεξεργασμένα με UHT προϊόντα, που αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες δωματίου. Η έρευνα οδήγησε πρόσφατα στη μείωση του μέγιστου υπολειμματικού ορίου στα προϊόντα βαθμού A στα 350 mU / l (Painter and Bradley 1997 Διεθνής Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων 1999). Οι Painter και Bradley (1997) βρήκαν λιγότερο από 150 mU / l της δραστηριότητας ALP σε μη παστεριωμένο γάλα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Σε μια συνεργατική μελέτη με φθοριομετρική ανάλυση, ο Rocco (1990) διαπίστωσε ότι το γάλα που έχει μολυνθεί με έως και 0,5% νωπό γάλα έδειξε λιγότερη από 265 mU / l δραστηριότητα ALP, υπογραμμίζοντας έτσι την ανάγκη επανεξέτασης των ισχυρόνων κανονιστικών προτύπων. Μια άλλη μελέτη (Klotz et al 2008) για τα γάλατα αγελάδας, αιγών και προβάτων υποδηλώνει επίσης ότι το

σημερινό όριο των 350 mU / l μπορεί να μειωθεί περαιτέρω, δεδομένου ότι τα επίπεδα ALP γάλακτος κασίικας ήταν <350 mU / l. Η υψηλή ευαισθησία των μεθόδων φθοριομετρίας και χημειοφωταύγειας προκάλεσε περαιτέρω παρόμοιες σκέψεις.

Τα πιο ακριβή αποτελέσματα της ανάλυσης ALP είναι εκείνα που έγιναν στο προϊόν αμέσως μετά τη θερμική επεξεργασία, πριν από την αποθήκευση και η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να επιτρέψει την εμφάνιση εξωγενών δραστηριοτήτων ALP (δηλ. μηδέν ανάλυση χρόνου).

5.4 Μέθοδοι προσδιορισμού της αλκαλικής φωσφατάσης

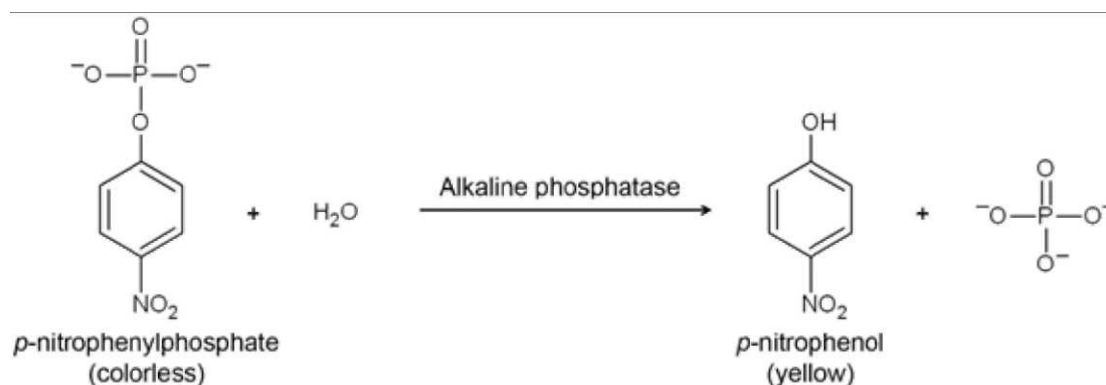
Η ενεργότητα της ALP εκφράζεται ως χιλιομονάδες ανά λίτρο (mU/l), όπου μία μονάδα ισούται με την ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή 1 μmol υποστρώματος ανά λεπτό. Οι τιμές μέτρησης της ALP ποικίλουν ανάλογα με την προέλευση του γάλακτος. Η επιτρεπόμενη τιμή από τις αρμόδιες Αρχές των ΗΠΑ και τις Ευρωπαϊκές Χώρες είναι τα 350 mU/l και η δοκιμασία της ALP θεωρείται αρνητική όταν η μετρούμενη ενεργότητα στο αγελαδινό γάλα δεν υπερβαίνει την τιμή αυτή (Rankin et al 2010).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της ενεργότητας της ALP μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 τύπους: **(α)** φωτομετρικές, **(β)** φθορισμομετρικές, **(γ)** χημειο-φωταυγειομετρικές και **(δ)** ανοσοχημικές. Η εφαρμογή τους έχει υιοθετηθεί εδώ και πολλά χρόνια, ωστόσο μόνο οι φωτομετρικές, φθορισμομετρικές και χημειοφωταυγειομετρικές μέθοδοι έχουν αναγνωρισθεί ως επικυρωμένες μέθοδοι για την επαλήθευση παστερίωσης των γαλακτομικών προϊόντων.

Φωτομετρικές

Οι φωτομετρικές μέθοδοι βασίζονται σε αντιδράσεις που χρησιμοποιούν χρωμογόνα υποστρώματα. Τα συνήθη υποστρώματα είναι το φαινυλοφωσφορικό, φωσφορικό π-νιτροφαινύλιο και η φωσφορική φαινυλοφθαλεΐνη, τα οποία υδrolύονται σε ανόργανο φωσφορικό και φαινόλη, π-νιτροφαινόλη ή φαινυλοφθαλεΐνη, αντίστοιχα (Fox et al 2006). Ειδικότερα, στις πρώτες φωτομετρικές μεθόδους που εφαρμόστηκαν, η ALP αφαιρεί μία φωσφορική ομάδα από το υπόστρωμα φαινυλο φωσφορικού δινατρίου. Η απελευθερούμενη ομάδα φαινόλης εκχυλίζεται με βουτανόλη και έπειτα αντιδρά με 2,6-διχλωροκινόνη-χλωριμίδη για να σχηματίσει ινδοφαινόλη, μια ένωση κυανού χρώματος. Η ενεργότητα της ALP στο δείγμα γάλακτος σχετίζεται με την απορρόφηση του διαλύματος

(Kay et al 1935). Στη συνέχεια, οι ερευνητές Aschaffenburg και Mullen το 1949 χρησιμοποίησαν π-φαινυλοφωσφορικό ως υπόστρωμα, του οποίου την υδρόλυση καταλύει η ALP σχηματίζοντας προϊόν κίτρινου χρώματος (π-νιτροφαινόλη) σε pH 10,0 (Εικόνα 14).



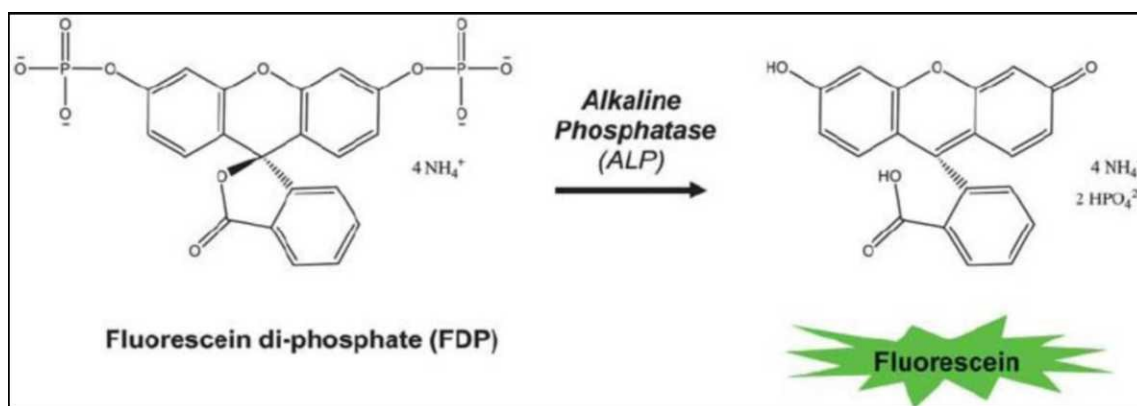
Εικόνα 14: Υδρόλυση φαινυλοφωσφορικού παρουσία ALP προς σχηματισμό του προϊόντος π-νιτροφαινόλη.

✚ Φθορισμομετρικές

Στις φθορισμομετρικές μεθόδους, ένας μη - φθορίζων αρωματικός μονοφωσφορικός εστέρας (fluorophos) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ALP στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η παρουσία της ALP στο δείγμα, σημειοδοτεί την υδρόλυση αυτού οπότε και αποδίδει ένα φθορίζον μόριο, η συγκέντρωση του οποίου προσδιορίζεται φθορισμομετρικά (διέγερση: 439 nm, εκπομπή: 560 nm). Οι φθορισμομετρικές μέθοδοι είναι περίπου 100-1000 φορές περισσότερο ευαίσθητες από τις φωτομετρικές δοκιμασίες (Yoshitomi 2004). Άλλα κοινά φθορισμογόνα υποστρώματα είναι το 4-μεθυλ-7-υδροξυκουμαρινυλ φωσφορικό (MUP), και η διφωσφορική 3,6-φλουορεσκεΐνη (FDP).

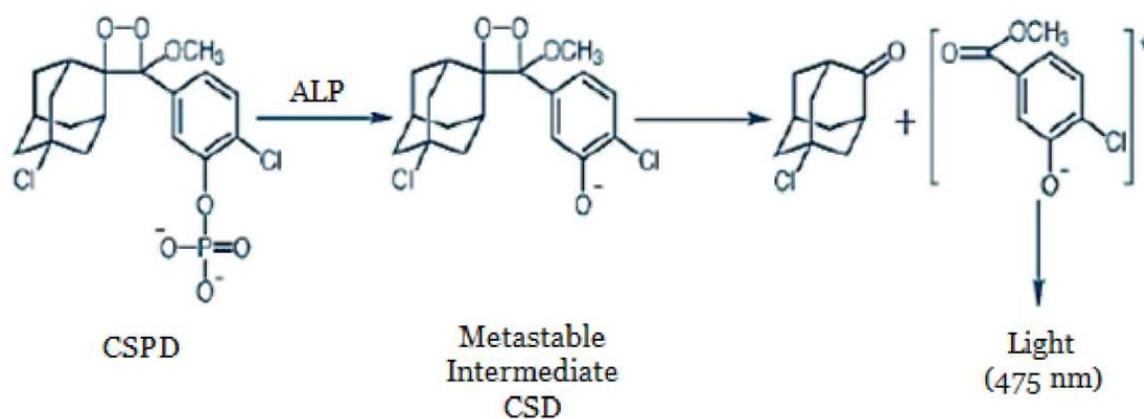
Η διαδοχική υδρόλυση με αλκαλική φωσφατάση των δύο φωσφορικών υποκαταστατών του FDP αποδίδει ασθενώς φθορίζουσα μονοφωσφορική φλουορεσκεΐνη ακολουθούμενη από έντονα φθορίζουσα φλουορεσκεΐνη (διέγερση / εκπομπή ~ 490/514 nm) (Park and Kim 2013, Mertz et al 2011) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Καταλυτική αντίδραση αποφωσφορυλίωσης διφωσφορικής φλουορεσκεΐνης, παρουσία ALP και μετέπειτα παραγωγή φλουορεσκεΐνης.

✚ Χημειοφωταυγειομετρικές

Οι χημειοφωταυγειομετρικές αναλύσεις στηρίζονται στη μεσολάβηση της ALP για την αποφωσφορυλίωση των υποστρωμάτων αδαμαντυλ-1,2-διοξετάνης (π.χ. αδαμάντυλ-1,2-διοξετάνη φαινυλοφωσφορικό, CSPD). Τα προαναφερθέντα υποστρώματα αναγνωρίζονται ειδικά και υδρολύονται από την ALP αποδίδοντας ένα προϊόν φαινοξειδίου, το οποίο αποσυντίθεται με την εκπομπή παρατεταμένης λάμψης φωτός που μετράται με λουμινόμετρο. Παρόμοια με τις προηγούμενες μεθόδους, όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του φωτός τόσο μεγαλύτερη και η ενεργότητα του ενζύμου (Rankin et al 2010) (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Ενζυμική αποφωσφορυλίωση της δεοξετάνης CSPD, παρουσία ALP, που οδηγεί σε σχηματισμό ενδιάμεσου φαινολικού ανιόντος, το οποίο αποσυντίθεται εκπέμποντας φως στα 475 nm.

✚ Άλλες τεχνικές που έχουν περιγραφεί είναι:

- Ανοσοχημική: όπως η ανταγωνιστική ELISA που χρησιμοποιεί πολυκλωνικά αντισώματα, ειδικά για την αναγνώριση και διάκριση της βόειας ALP από τη μικροβιακή (Vega-Warner et al 2000).
- Βιοαισθητήρας τύπου ταινίας ξηρών αντιδραστηρίων: όπου ως ιχνηθέτες χρησιμοποιούνται νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) και η θετική αντίδραση εξακριβώνεται από τη χρωματική αλλαγή στη ζώνη ελέγχου λόγω συσσώρευσης των AuNPs (Ling et al 2015).
- Χρωματογραφική: όπου μετά την ενζυμική υδρόλυση του υποστρώματος η π-νιτροφαινόλη εκχυλίζεται και προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και μέτρηση απορρόφησης στα 319 nm (Lakra et al. 2016).

Η σωστή μέτρηση φωσφατάσης στο γάλα γίνεται είτε ποσοτικά με τη χρήση ειδικών αναλυτικών συσκευών (λουμινόμετρο ή φασματοφωτόμετρο) είτε ποιοτικά για να εξακριβωθεί το επίπεδο φωσφατάσης στο παστεριωμένο γάλα ή η εν γένει παρουσία του σε αυτό αμέσως μετά την ολοκλήρωση της παστερίωσης. Για σωστή παστερίωση έχουν θεσμοθετηθεί όρια στα 350 mU/l αλλά αυτά έχουν δοθεί σε παρελθόντες δεκαετίες που η έρευνα και ανάλυση των επιπτώσεων της παρουσίας φωσφατάσης στο γάλα ήταν ελλειπείς και τα διαθέσιμα τεστ ανίχνευσης ελάχιστα και χωρίς μεγάλη ευαισθησία. Πρακτικά, στη σύγχρονη εποχή, τα όρια της φωσφατάσης οφείλουν να είναι σχεδόν μηδενικά αφού ως φυσικό ένζυμο στο γάλα πρέπει να καταστρέφεται κατά την παστερίωση και να είναι πρακτικά μη ανιχνεύσιμο. Με αυτό τον τρόπο, οι μονάδες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων είναι διασφαλισμένες ότι η φωσφατάση, ως δείκτης μέτρησης, κατοχυρώνει την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών κατά τη παστερίωση. Όσο πιο υψηλές είναι οι συγκεντρώσεις της φωσφατάσης στο παστεριωμένο γάλα (στις ποσοτικές μετρήσεις), είτε βρίσκονται κοντά στο όριο ανίχνευσής της (στις ποιοτικές μετρήσεις), αποτελεί προειδοποιητικό παράγοντα για τη μη σωστή εκτέλεση της παστερίωσης, αφού κατά τη θερμική επεξεργασία του γάλακτος κανονικά η φωσφατάση απενεργοποιείται.

Στη συνέχεια παρατίθενται δύο κατηγορίες ποσοτικής και ποιοτικής ανάλυσης της φωσφατάσης και τα κύρια τεστ ανίχνευσής της, σε αντιδιαστολή με το τεστ LACTOPAST που επινοήθηκε και εφαρμόστηκε στην παρούσα διατριβή.

5.4.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

5.4.1.1 Με τη χρήση Λουμινόμετρου

- **CHARM F-AP:** Προϊόν της εταιρείας CHARM SCIENCES Inc. – Κίνα εφαρμόζει διαδικασία ενός βήματος χωρίς προετοιμασία δείγματος και δίνει αποτελέσματα σε 45-90 sec (ανάλογα τη φύση του δείγματος). Όριο ανίχνευσης της φωσφατάσης ορίζεται από την κατασκευάστρια εταιρεία τα 20 mU / l. Το προϊόν έχει πιστοποιηθεί από τις US National Conference of Interstate Milk Shipments (NCIMS), New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry (MAF), Tasmanian Dairy Industry Authority (TDIA). Το τεστ αυτό χρησιμοποιεί ένα αντιδραστήριο, επάξεται σε θερμοκρασία δωματίου πριν την πρόσθεση του δείγματος, δίνει ποσοτική τιμή φωσφατάσης στο παστεριωμένο γάλα και απαιτεί τη χρήση λουμινόμετρου.
- **ZymoSnap ALP:** Προϊόν της εταιρείας HYGIENA – ΗΠΑ έχει τη δυνατότητα να μετράει τα επίπεδα φωσφατάσης κάτω από τα 350 mU/l και συγκεκριμένα στα 222 mU/l. Για την πραγματοποίηση του τεστ απαιτείται θερμοκρασία δωματίου, επώαση των δειγμάτων και του αντιδραστηρίου στους 37 °C σε υδατόλουτρο ή σε πλάκα Peltier, συσκευή λουμινόμετρου, πιπέττες μεταβλητού όγκου. Δίνει αποτέλεσμα σε 15 min.

5.4.1.2 Με τη χρήση Φασματοφωτόμετρου

- **CHARM PASLite:** Προϊόν της εταιρείας CHARM SCIENCES Inc. – Κίνα απαιτεί θερμοκρασία δωματίου, προετοιμασία δειγμάτων και αντιδραστηρίων σε φυγόκεντρο, επώαση για 3 min των δειγμάτων και αντιδραστηρίων στους 37 °C σε υδατόλουτρο ή σε πλάκα Peltier, συσκευή φασματοφωτόμετρου, πιπέττες μεταβλητού όγκου. Δίνει αποτέλεσμα σε 45-90 sec (ανάλογα τη φύση του δείγματος). Όριο ευαισθησίας για ανίχνευση φωσφατάσης σε δείγμα 20.5 mU/L. Το προϊόν έχει πιστοποιηθεί κατά ISO 22160/IDF 209.

5.4.2 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

- ❖ **SENSOBIZ APT:** Προϊόν της εταιρείας NANObiz Nano Biyo Teknolojik Sistemler - Τουρκία αναφέρει ότι δεν απαιτείται επώαση δείγματος και αντιδραστηρίων, δίνει αποτέλεσμα σε 5-10 min, λειτουργεί σε θερμοκρασία δωματίου και έχει όριο ευαισθησίας για ανίχνευση φωσφατάσης σε παστεριωμένο γάλα τα 120 mU/l. Η μέθοδος αυτή είναι σύμφωνη με την 91/180/EC που αναφέρει ότι το παστεριωμένο γάλα πρέπει να δίνει αρνητικό αποτέλεσμα παρουσίας φωσφατάσης ενώ το θερμασμένο γάλα πρέπει να δίνει θετικό αποτέλεσμα φωσφατάσης. Χρησιμοποιεί ταινίες μέτρησης με χρωματική απεικόνιση.
- ❖ **Phosphatesmo Mi:** Προϊόν της εταιρείας MACHEREY-NAGEL – Γερμανία προϋποθέτει επώαση 60 min στους 36 °C σε υδατόλουτρο ή σε πλάκα Peltier, δίνει αποτέλεσμα αμέσως μετά την επώαση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Όριο ευαισθησίας για ανίχνευση φωσφατάσης σε δείγμα 1750 mU/l. Χρησιμοποιεί ταινίες μέτρησης με χρωματική απεικόνιση.
- ❖ **BIOO Scientific MaxSignal:** Προϊόν της εταιρείας BIOO Scientific ΗΠΑ είναι χρωματογραφική μέθοδος. Τα αντιδραστήριά της συντηρούνται σε θερμοκρασία 2-8 °C και έχουν διάρκεια ζωής 12 μήνες. Για την πραγματοποίηση του τεστ είναι απαραίτητη η επώαση 30 min στους 37 °C σε υδατόλουτρο ή σε πλάκα Peltier, δίνει αποτέλεσμα αμέσως μετά την επώαση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Όριο ευαισθησίας για ανίχνευση φωσφατάσης σε δείγμα 700 mU/l.
- ❖ **Lactognost III:** Προϊόν της εταιρείας Heyl – Γερμανία το οποίο είναι από τα παλιότερα τεστ ανίχνευσης της αγοράς. Απαιτείται επώαση 60 min στους 37 °C σε υδατόλουτρο ή σε πλάκα Peltier, δίνει χρωματογραφικό αποτέλεσμα μετά την επώαση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Όριο ευαισθησίας για ανίχνευση φωσφατάσης σε δείγμα 350 mU/l.
- ❖ **Alkaline Phosphatase:** Προϊόν της εταιρείας Hardy Diagnostics – ΗΠΑ χρησιμοποιεί αντιδραστήρια. Απαιτείται επώαση 30-60 min στους 37 °C σε υδατόλουτρο ή σε πλάκα Peltier, δίνει αποτέλεσμα μετά την επώαση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου. Όριο ευαισθησίας για ανίχνευση φωσφατάσης σε δείγμα 700 mU/l.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΟΛΙΚΑ ΣΩΜΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

6.1 Εισαγωγικά στοιχεία - Μικροβιολογική προσέγγιση του γάλακτος

Κατά τη διαδικασία της άλμεξης του ζώου και την συλλογής του γάλακτος υπό ασηπτικές συνθήκες, το γάλα περιέχει έναν αριθμό μικροοργανισμών, που η συγκέντρωσή τους διαφοροποιείται ανάλογα με τις συνθήκες παραγωγής του. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να επιφέρουν μια αλληλουχία μεταβολικών αλλαγών στα συστατικά του γάλακτος που οδηγεί στη μείωση της ζωής του. Το μικροβιακό φορτίο και η επιμόλυνση του γάλακτος χωρίζεται σε εσωγενή (αφορά το γάλα που συγκεντρώνεται στις γαλακτοφόρους οδούς και όχι από την έκκρισή του από τα αδενικά κύτταρα του μαστού) και εξωγενή (η πιθανή μόλυνση από τη στιγμή που το γάλα εξέρχεται από το μαστό και συλλέγεται στα δοχεία συλλογής). Το γάλα έχει μικρό ή μεγάλο αριθμό βακτηρίων, τα οποία αποτελούν την μικροχλωρίδα του γάλακτος. Ο αριθμός των μικροοργανισμών περιορίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ζώου και από αντιμικροβιακούς παράγοντες που εκκρίνονται με το γάλα.

Το γάλα που παράγεται από υγιή ζώα, όταν εκκρίνεται από τα αδενικά κύτταρα του μαστικού αδένος θεωρητικά είναι στείρο και δεν περιέχει μικροοργανισμούς (Sandholm et al 1995). Εκτίθεται όμως στη συνέχεια σε πολλές εστίες πηγών μόλυνσης. Όμως κατά τη συγκέντρωσή του, στο γαλακτοφόρο κόλπο του μαστού παύει να είναι στείρο, καθώς επιμολύνεται από μικρό αριθμό βακτηρίων από τα γένη *Streptococcus*, *Lactococcus* και *Micrococcus* (Μάντης 2000), τα οποία αποτελούν τη μικροχλωρίδα του γαλακτοφόρου κόλπου του μαστού. Το πρώτο στάδιο κατά το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί επιμόλυνση του γάλακτος, είναι κατά την έκκριση και την προσωρινή παραμονή του γάλακτος στον γαλακτοφόρο κόλπο του μαστού, στην περίπτωση που υπάρχει μία λοίμωξη στο μαστό (μαστίτιδα). Στην περίπτωση αυτή, η μικροβιακή χλωρίδα, υφίσταται σημαντικές διαφοροποιήσεις και το γάλα τελικά εξέρχεται από το μαστό του ζώου επιμολυσμένο με τους παθογόνους μικροοργανισμούς που σχετίζονται με την εμφάνιση της μαστίτιδας. Επομένως, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στη συστηματική παρακολούθηση της υγείας του μαστού των αιγών για την έγκαιρη διάγνωση τόσο της κλινικής, όσο και της υποκλινικής μαστίτιδας.

Η ποιότητα του γάλακτος μπορεί, να εκτιμηθεί από τη μέτρηση του μικροβιακού πληθυσμού στο γάλα, είτε με τον προσδιορισμό των ολικών βακτηρίων {*OMX: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα* ή *TBC: Total Bacteria Count* ή *CFU: colony forming untits*}, είτε με την παρουσία συγκεκριμένων ειδών μικροοργανισμών. Το ενδιαφέρον σχετικά με την παρουσία βακτηρίων στο γάλα σχετίζεται με την υγεία του καταναλωτή.

Η ποιότητα του γάλακτος, όσον αφορά το μικροβιακό περιεχόμενο καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τον τύπο του προϊόντος που προκύπτει (Muir 1996). Επίσης, υψηλό μικροβιακό φορτίο στο φρέσκο γάλα σημαίνει πιθανά προβλήματα σε ό,τι αφορά την ασφάλεια του τελικού προϊόντος (Gonzalo et al 2006). Λίγες πληροφορίες υπάρχουν σχετικά με την OMX στο γάλα του προβάτου (Muehlherr et al 2003), ενώ στην αγελάδα υπάρχουν στοιχεία που συσχετίζουν την OMX με την κλινική και υποκλινική μαστίτιδα (Jayarao and Wolfgang 2003 Zadoks et al 2004).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες ανώτατο επιτρεπτό όριο για τον πληθυσμό των μικροοργανισμών στο αγελαδινό γάλα είναι 100.000 - 300.000 κύτταρα/mL. Για την οικογένεια των Κολοβακτηριδίων (*Coliform*) των οποίων η παρουσία είναι ενδεικτική ότι το γάλα παράγεται σε συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη παθογόνων, τα νόμιμα όρια στις ΗΠΑ για το παστεριωμένο γάλα είναι μικρότερο των 10 cfu/mL. Ένα προτεινόμενο όριο για το φρέσκο γάλα είναι τα 100 cfu/mL.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση με τις Οδηγίες 92/46 και 94/71 και τους Κανονισμούς (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 και 1441/2007 καθόρισε τα κριτήρια υγιεινής και βακτηριολογικής ποιότητας του αιγοπρόβειου γάλακτος όπως αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4 : Μικροβιολογικά κρίσιμα όρια: (Οδηγία 92/46/ΕΟΚ , Καν. ΕΚ αριθ. 2073/2005, Καν. ΕΚ αριθ. 1441/2007)

	n	c	m	M
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Απουσία σε 25 g	
<i>Salmonella</i> sp.	5	0	Απουσία σε 25 g	
<i>Staphylococcus aureus</i> (cfu/g)	5	2	$\leq 1 \times 10^2$	$\leq 1 \times 10^3$
<i>Echerichia coli</i> (cfu/g)	5	2	$\leq 1 \times 10^2$	$\leq 1 \times 10^3$
Κολοβακτηριοειδή (cfu/g)	5	2	$\leq 1 \times 10^4$	$\leq 1 \times 10^5$

n= αριθμός μονάδων δειγματοληψίας που αποτελούν το δείγμα

c = αριθμός μονάδων δειγματοληψίας με τιμές μεγαλύτερες του m ή μεταξύ m και M.

Τα καθοριζόμενα όρια αναφέρονται σε κάθε μονάδα του δείγματος που υποβάλλεται σε έλεγχο. Τα αποτελέσματα των δοκιμών αποδεικνύουν τη μικροβιολογική ποιότητα της ελεγχθείσας διαδικασίας.

- Ικανοποιητική, εάν όλες οι τιμές που παρατηρούνται είναι $\leq m$,
- Αποδεκτή, εάν ένας μέγιστος αριθμός τιμών c/n είναι μεταξύ m και M και οι υπόλοιπες τιμές που παρατηρούνται είναι $\leq m$,
- Μη ικανοποιητική, εάν μία ή περισσότερες από τις τιμές που παρατηρούνται είναι $> M$ ή αριθμός τιμών μεγαλύτερος από c/n είναι μεταξύ m και M.

6.2 Πηγές μόλυνσης του γάλακτος

➤ Εσωγενής μόλυνση

Γίνεται από μικρόβια απεκκρινόμενα με το γάλα ή από μικρόβια που βρίσκονται είτε από το εσωτερικό του μαζικού αδένου, είτε από το εσωτερικό των γαλακτοφόρων πόρων και των θηκών του μαστικού αδένου. Τα μικρόβια αυτά προκαλούν γενικές λοιμώξεις στο ζώο φορέα όπως βακτηριαμία, πυαιμία, ιαιμία, παρασιταίμια και μαστίτιδες, ο αριθμός των οποίων αυξάνει από την ατελή άμελξη του ζώου και από περιβαλλοντικές συνθήκες. Σημαντικές είναι οι αιματογενείς μολύνσεις, όταν εισέρχονται οι μικροοργανισμοί στο γάλα μέσω του αίματος, ως επί το πλείστον βακτήρια (όπως η *Brucella abortus* και το *Mycobacterium tuberculosis*).

➤ Εξωγενής μόλυνση

Παρουσιάζεται από:

1. Από το ίδιο το ζώο, είτε από τις ακαθαρσίες του σώματός του, των μαστών του, είτε από το τρίχωμα της ουράς, των κοπράνων και των ούρων του, που πέφτουν στο γάλα κατά τη στιγμή της άμελης.
2. Από τον εξοπλισμό της άμελης.
3. Από τον εξοπλισμό της ψύξης του γάλακτος.
4. Από τον αμελκτή χρήστη, ο οποίος βήχει ή φτερνίζεται, ή από τη σκόνη των ενδυμάτων του, ή από τα χέρια και τα νύχια του, ή από τις τρίχες της κεφαλής του.
5. Από τα δοχεία άμελης τα οποία πλένονται με ακάθαρτα νερά χωρίς να αποστειρωθούν.
6. Από χρησιμοποιούμενο νερό: Σημαντικό ρόλο έχει η ποιότητα του χρησιμοποιούμενου νερού που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό, γιατί έχει αποδεχθεί ότι από αυτό προέρχονται, όταν δεν είναι καθαρό, μεγάλος αριθμός κολοβακτηριδίων και ψυχρόφιλων βακτηρίων.
7. Από τον ατμοσφαιρικό αέρα που περιέχει σκόνες, αιωρούμενα σωματίδια, κοπριά, βακτήρια και μύκητες.
8. Από την παρουσία εντόμων, τα οποία σε στάβλους βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες.
9. Από το νεφέλωμα του κονιορτού που δημιουργείται στην ατμόσφαιρα γύρω από το ζώο κατά τη διάρκεια της περιποίησης του, από τον εισερχόμενο ατμοσφαιρικό αέρα και από τις κινήσεις του ζώου.

Αρχικά, ο αριθμός των βακτηρίων είναι μικρός αλλά αυξάνει εκθετικά διότι το γάλα είναι ένα άριστο θρεπτικό υλικό υπόστρωμα ελαφρώς όξινου pH που περιέχει άφθονη υγρασία, σάκχαρα και πρωτεΐνες. Εδώ πρέπει να αναφερθεί και η σημασία που παίζει η κατάλληλη θερμοκρασία. Σε πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει διαπιστώθηκε ότι στους 10 °C και σε χρονικό διάστημα 24 h, ο αριθμός των βακτηρίων είναι 90 -100 φορές μεγαλύτερος του αρχικού ενώ στους 30 °C σε 24 h η εκθετική αύξηση αγγίζει το 5000%. Γενικά παρατηρείται μεγάλη ποικιλία στον αριθμό και το είδος των μικροοργανισμών, η οποία εξαρτάται από τις συνθήκες υγιεινής που επικρατούν κατά την άμεληση, τη συλλογή και τη συντήρηση του γάλακτος (Μάντης, Παπαγεωργίου, Φλετούρης και Αγγελίδης 2015).

Γενικά, οι επιμολύνσεις του γάλατος σε οποιοδήποτε στάδιο από τα παραπάνω και αν συμβαίνουν μπορεί να αφορούν είτε σε παθογόνους μικροοργανισμούς είτε σε μη παθογόνους περιβαλλοντικούς μικροοργανισμούς. Οι επιμολύνσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς μπορεί να προέρχονται είτε από το ίδιο το ζώο (π.χ. *Brucella* spp., *Listeria* spp.), είτε από το περιβάλλον (π.χ. *Staphylococcus* spp.). Από τους μικροοργανισμούς αυτούς τα βακτήρια έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη δημόσια υγεία (Μάντης, Παπαγεωργίου, Φλετούρης και Αγγελίδης 2015). Τα κυριότερα παθογόνα βακτήρια που μπορεί να επιμολύνουν το γάλα ανήκουν στα γένη *Staphylococcus* spp., *Campylobacter*, *Salmonella*, *Leptospira*, *Pasteurella*, *Shigella*, *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Brucella* spp., και *Mycobacterium* spp. Επίσης, η *Listeria monocytogenes*, ο *Bacillus anthracis*, η *Yersinia enterocolitica*, τα εντεροπαθογόνα στελέχη της *Escherichia coli*, ο *Staphylococcus aureus*, το *Clostridium botulinum*, ο *Bacillus cereus*, το *Clostridium perfringens*, το *Corynebacterium diphtheriae*, ο *Streptobacillus moniformis*, η *Pseudomonas pseudomallei* και το *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* είναι μερικά ακόμη παθογόνα βακτήρια που μπορεί να επιμολύνουν το γάλα (Mowlem 1988, Μάντης 2000).

6.3 Μικροβιακή ποιότητα του γάλακτος – Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα

6.3.1 Προσδιορισμός της μόλυνσης του γάλακτος

Για τον προσδιορισμό της μόλυνσης του γάλακτος σημαντικό εργαλείο είναι η ποσοτική βακτηριολογική εξέταση, κατά την οποία μετρείται η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX) σε 1 mL γάλακτος. Υπάρχουν 2 τρόποι μέτρησης, η άμεση και η έμμεση.

1. Με την άμεση μέθοδο απαριθμούνται νεκρά και ζωντανά βακτήρια. Η διαδικασία είναι η ακόλουθη: Σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα απλώνεται ποσότητα γάλακτος ίση με 0,01 mL, μονιμοποιείται και χρωματίζεται με μια σειρά χρώσεων. Μικροσκοπικά, απαριθμούνται όλα τα βακτήρια από το δείγμα αυτό και ο συνολικός αριθμός που προκύπτει, πολλαπλασιάζεται επί 10.
2. Με την έμμεση μέθοδο απαριθμούνται μόνο τα ζωντανά βακτήρια του γάλακτος. Παρασκευάζονται αραιώσεις του προς εξέταση γάλακτος σε θρεπτικό ζωμό μέχρι αραιώσης 1/ 10.000 από τις οποίες ενοφθαλμίζεται 1 mL

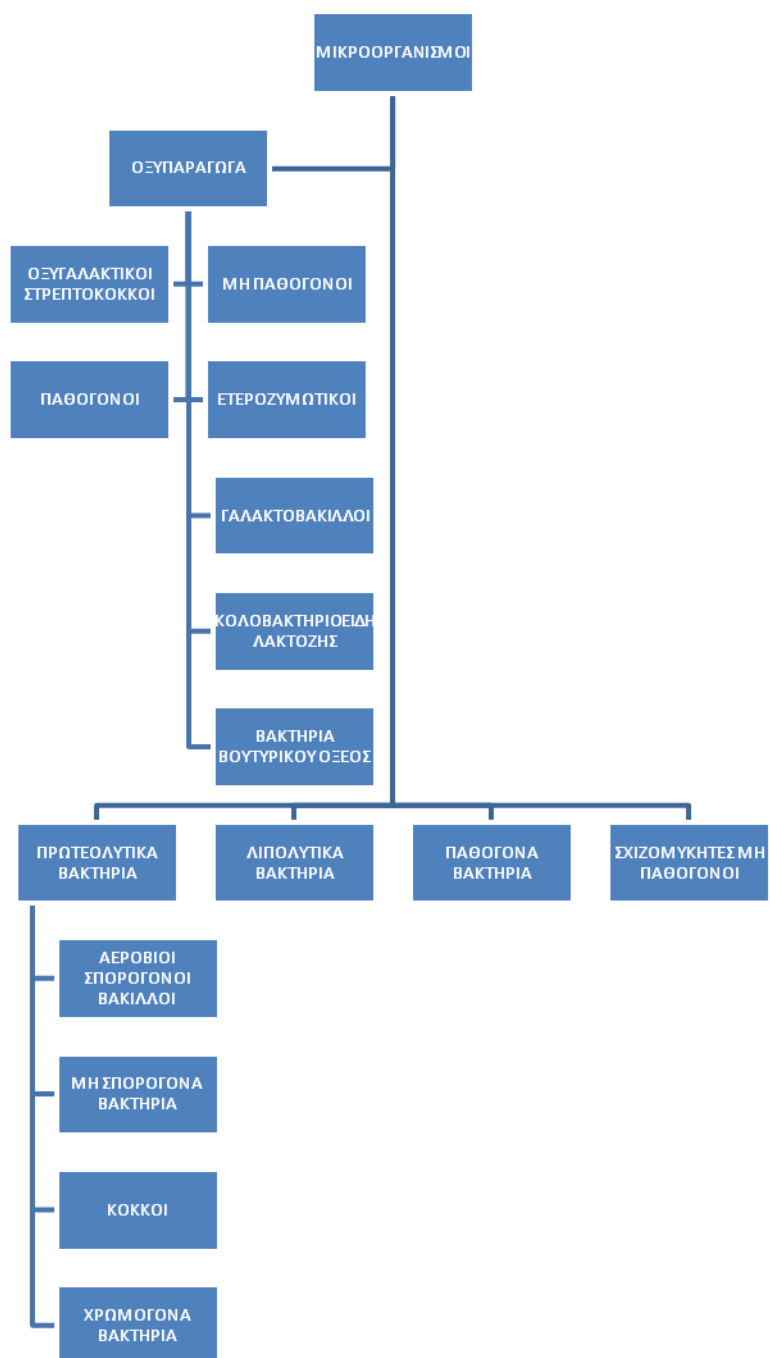
σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και επωάζεται για 48 h στους 32-33 °C. Μετά το πέρας της επώασης, απαριθμούνται οι εμφανιζόμενες αποικίες και ο αριθμός τους ανάγεται σε 1 mL αδιάλυτο γάλα.

Για τον περιορισμό της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας του γάλακτος πρέπει να μην αμέλγονται ασθενή ζώα ή ζώα που πάσχουν από μαστίτιδα. Επίσης, ο μαστός πρέπει να αμέλγεται ικανοποιητικά χωρίς τεράστια μηχανική καταπόνησή του, έτσι ώστε να μην απομένει ποσότητα γάλακτος μέσα σε αυτόν, διότι ευνοεί την δημιουργία και πολλαπλασιασμό βακτηριακών εστιών στις γαλακτοφόρες οδούς. Τέλος, ο μαστός πριν από κάθε άμελξη πρέπει να καθαρίζετε επιμελώς.

Εμβάθυνση στη μικροχλωρίδα του γάλακτος:

Στο γάλα, ως μέσο, απαντώνται πολλοί και διάφοροι μικροοργανισμοί. Πολλοί από αυτούς είναι ευεργετικοί διότι έχουν σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές ζυμώσεις του γάλακτος, ενώ άλλοι είναι ανεπιθύμητοι και επικίνδυνοι για τη δημόσια υγεία. Οι μικροοργανισμοί χωρίζονται ανάλογα με τη σημασία που έχουν στη γαλακτοκομία και στην υγιεινή του γάλακτος.

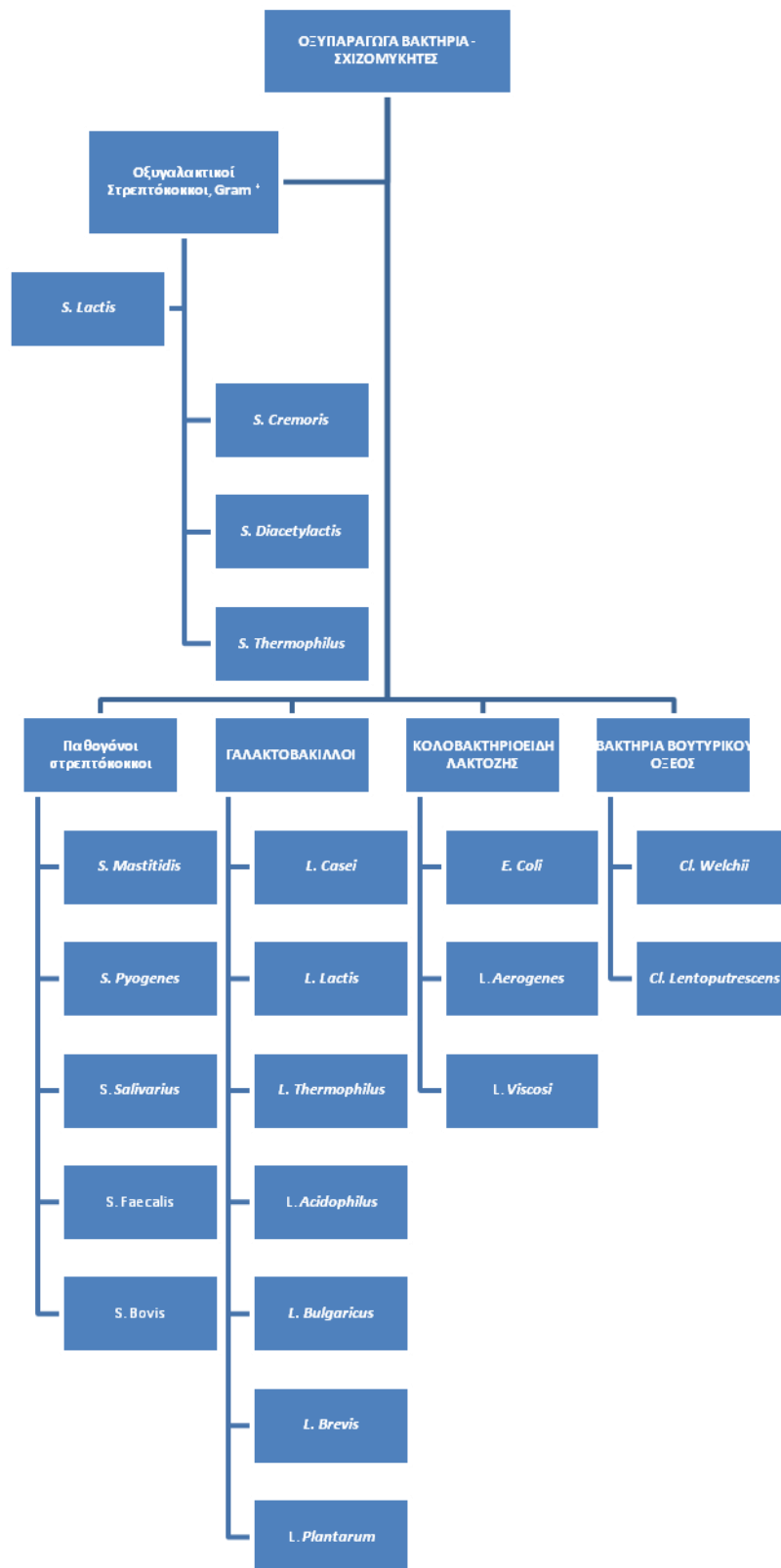
ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Κυρίαρχες ομάδες μικροοργανισμών που ανιχνεύονται στο γάλα.



Στο γάλα απαντούν 5 ομάδες μικροοργανισμών (Πίνακας 5) που αναφέρονται ως:

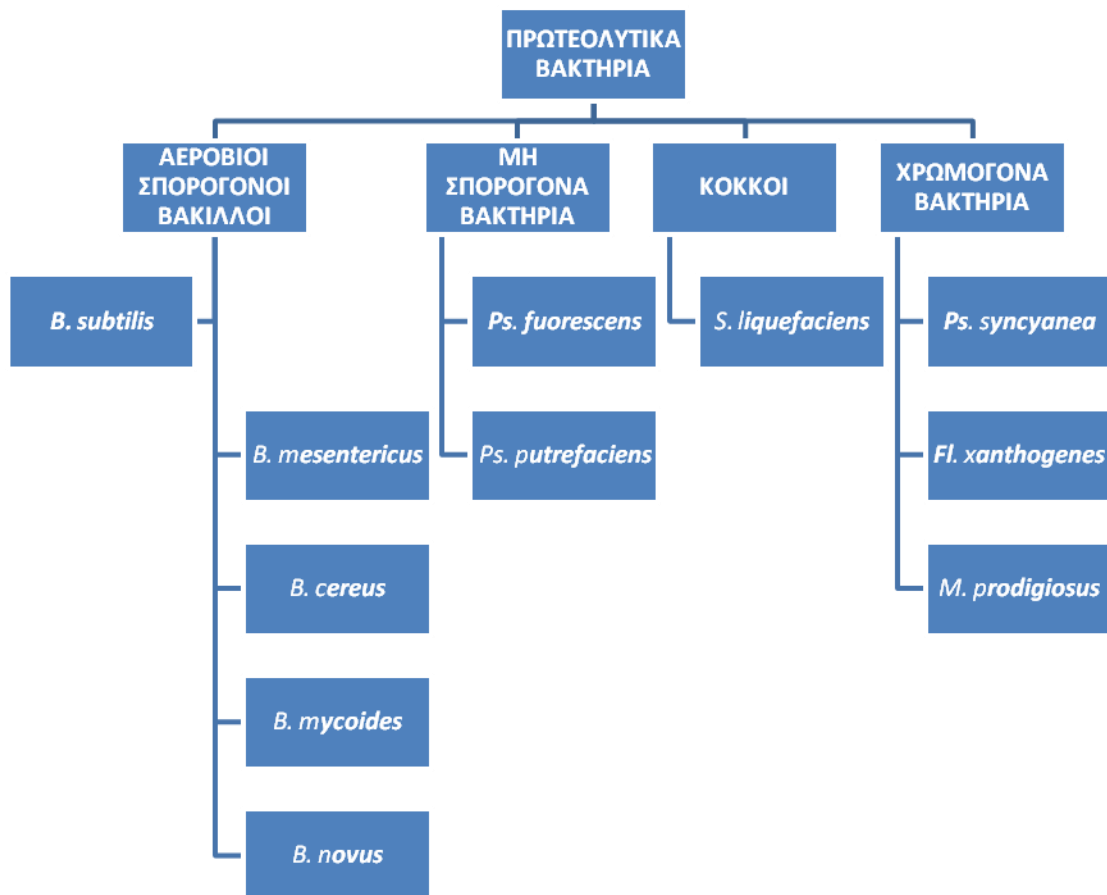
1. Οξυπαράγωγα βακτήρια (Πίνακας 6), περιλαμβάνει σχιζομύκητες που παράγουν οξέα σε καθαρή καλλιέργεια και σε αποστειρωμένο γάλα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Οξυπαράγωγα βακτήρια που ανιχνεύονται στο γάλα.



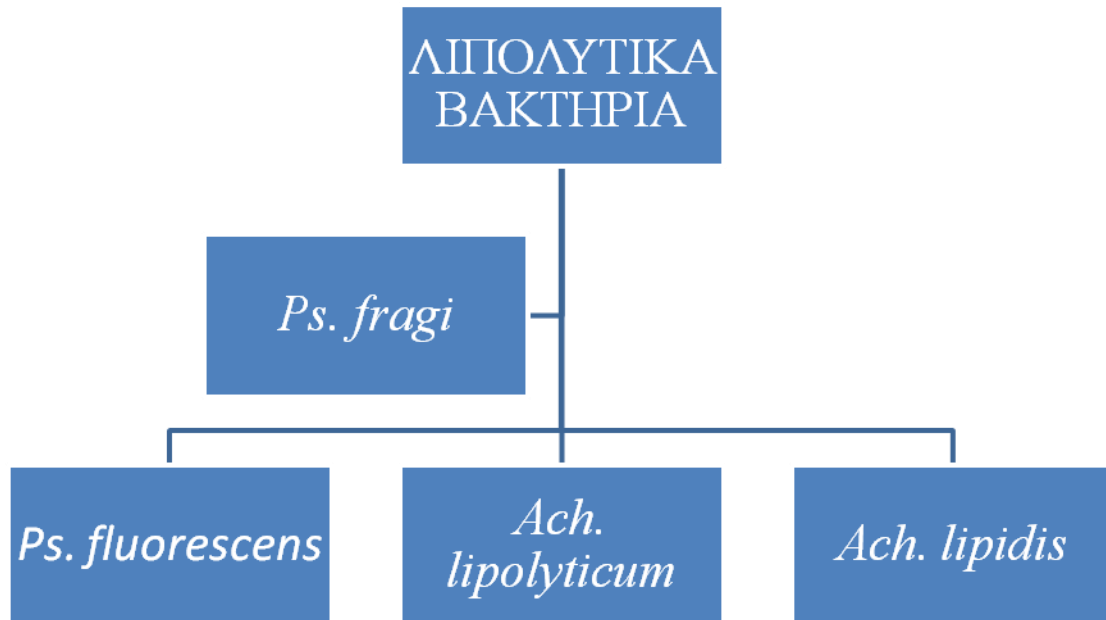
2. Πρωτεολυτικά βακτήρια (Πίνακας 7), υδρολύουν την καζεΐνη και προκαλούν την πήξη του γάλακτος, με την έκκριση ρενίνης και όχι με την παραγωγή οξέος. Αναπτύσσονται, αρχικά, επιφανειακά στην κρέμα και αργότερα εξαπλώνονται σε όλη τη μάζα του γάλακτος το οποίο και πήζει. Ο *L. lactis* παρεμποδίζει την ανάπτυξή τους και αφθονούν στο παστεριωμένο γάλα. Μερικά από αυτά δημιουργούν οξύ και δίνουν διαφορετικό χρώμα στο γάλα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Πρωτεολυτικά βακτήρια που ανιχνεύονται στο γάλα.



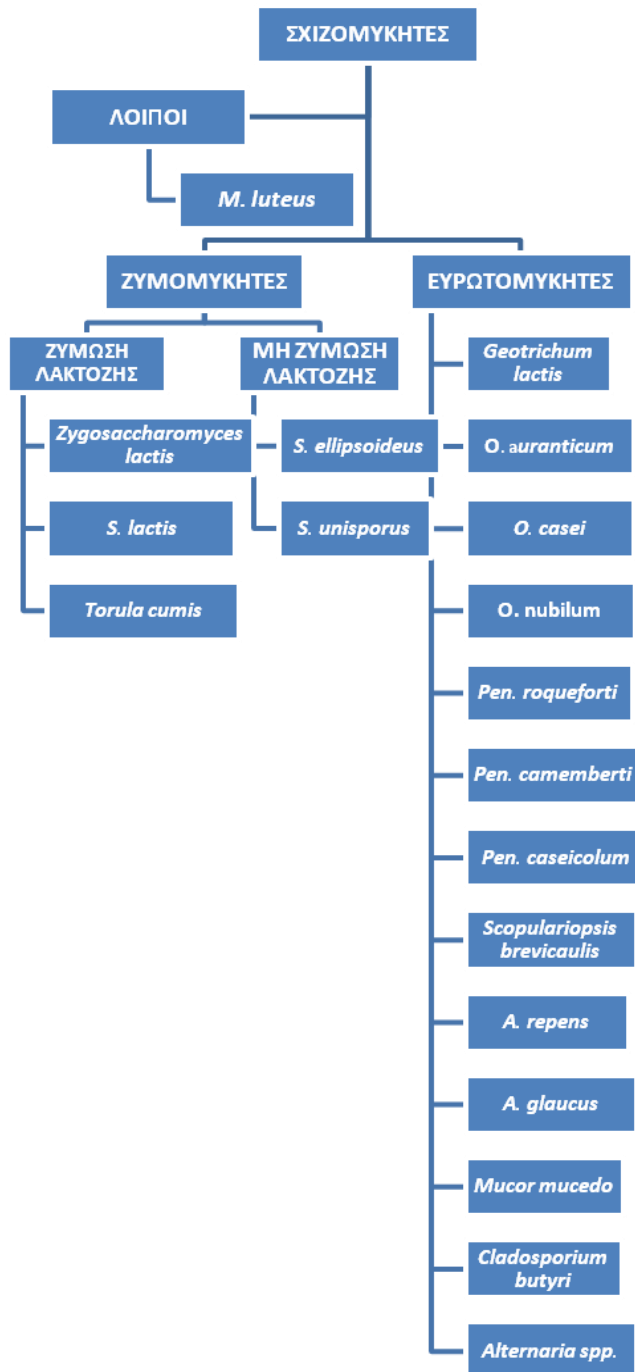
3. Λιπολυτικά βακτήρια (Πίνακας 8), στην κατηγορία αυτή ανήκουν πολλοί μικροοργανισμοί που έχουν ως κύριο γνώρισμά τους την υδρόλυση του λίπους και την απελευθέρωση λιπαρών οξέων. Άμεσο αποτέλεσμα αυτής της χημικής διεργασίας είναι η αλλοίωση της γεύσης και της οσμής του γάλακτος και των παραγόμενων προϊόντων του. Δεν είναι λίγοι οι μικροοργανισμοί της ομάδας αυτής που υδρολύουν και τις πρωτεΐνες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Λιπολυτικά βακτήρια που ανιχνεύονται στο γάλα.



4. Λοιποί σχιζομύκητες μη παθογόνοι (Πίνακας 9). Αυτοί αναπτύσσονται βραδέως στο γάλα, αλλά δεν προκαλούν σοβαρές φυσικοχημικές μεταβολές.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Σχιζομύκητες που ανιχνεύονται στο γάλα.



5. Παθογόνα βακτήρια, τα οποία είναι σπάνια να εμφανιστούν στο γάλα όταν το παραγωγικό ζώο είναι υγιές και όταν λαμβάνονται μέτρα αποφυγής μόλυνσης του γάλακτος κατά τη συλλογή του. Η πηγή προέλευσής τους είναι είτε από το περιβάλλον, είτε από το ζώο και ενίοτε από τον αμελκτή χρήστη.

Επίδραση της μικροχλωρίδας στο γάλα – ζυμώσεις

Η μικροχλωρίδα του γάλακτος προκαλεί σε αυτό φυσικοχημικές μεταβολές που ονομάζονται ζυμώσεις. Η δράση της ζύμωσης αρχίζει μετά από ένα εύλογο χρονικό διάστημα από τη στιγμή της άμελξης, ανάλογα το μέγεθος της μόλυνσης και τη θερμοκρασία συντήρησης του γάλακτος. Τα κύρια χαρακτηριστικά της ζύμωσης είναι η πήξη, η μεταβολή του χρώματος, της οσμής και της γεύσης του γάλακτος. Οι ζυμώσεις διακρίνονται σε φυσιολογικές και μη φυσιολογικές. Οι μη φυσιολογικές ή ανώμαλες προκαλούν σοβαρά προβλήματα στην γαλακτοκομία.

1. Φυσιολογικές ή ομαλές ζυμώσεις:

- i. Στάδιο βακτηριοστασίας – Η ανασχετική ικανότητα του γάλακτος στην ανάπτυξη των διαφόρων βακτηρίων μέσα από την ενεργοποίηση των αντιμικροβιακών του συστημάτων.

	Αντιμικροβιακά Συστήματα	Αντιπρόσωποι
α)	Ανοσοσφαιρίνες	IgA, IgG, IgM
β)	Λευκοκύτταρα	Φαγοκύτταρα, 10% των λευκοκυττάρων
γ)	Ένζυμα	Ενζυμικό σύστημα LP/SCN-/H ₂ O ₂ . Σύμπλοκο λακτοφαινόλης-υπεροξειδάσης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τα θειοκυανικά άλατα.
δ)	Αντισώματα	Προπερδίνη
ε)	Πολυπεπίδια	Λυσοζύμη
στ)	Διαφορες πτητικές ουσίες	Οξικά, βουτυρικό, μυρμηκικό αλδεΐδες, κετόνες, αμίνες, αλκοόλες, θειούχες ενώσεις.

- ii. Στάδιο οξίνισης – Στο σημείο αυτό αναπτύσσονται απότομα οξυγαλακτικά βακτήρια με παραγωγή γαλακτικού οξέος που επιφέρει τη πήξη της καζεΐνης, η οποία αποχωρίζεται από τον ορό του γάλακτος και καθιζάνει. Μόλις το pH φτάσει στα επίπεδα 4,2 – 4,4 σταματά η ανάπτυξη των οξυπαραγωγών βακτηρίων λόγω της οξύτητας του υποστρώματος.
 - iii. Στάδιο εξουδετέρωσης – Αναπτύσσονται οι ευρωτομύκητες και οι ζυμομύκητες που καταναλώνουν το γαλακτικό οξύ και το pH γίνεται αλκαλικό υπό την επίδραση των παραγόντων θερμοκρασίας και χρόνου. Μόλις το pH αρχίσει να ανεβαίνει προς το αλκαλικό επίπεδο, επεμβαίνουν τα πρωτεολυτικά βακτήρια που αποδομούν τις πρωτεΐνες και παράγουν αλκαλικές ουσίες που με τη σειρά τους εξουδετερώνουν το γαλακτικό οξύ και έτσι το pH σταθεροποιείται σε πλήρες αλκαλικό επίπεδο. Έτσι, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, μέσα στο νέο αλκαλικό περιβάλλον, ενεργοποιούνται και συνεχίζουν τη ζύμωση της λακτόζης με ταυτόχρονη άνοδο του pH.
 - iv. Στάδιο σήψης – Στο αλκαλικό γάλα αναπτύσσονται άλλοι σχιζομύκητες, προκαλώντας σήψη με αποδόμηση της καζεΐνης, τάγγιση του λίπους και ρευστοποίηση του τυροπήγματος. Το γάλα έτσι αποκτά κακοσμία και γίνεται τοξικό.
2. Μη φυσιολογικές ή ανώμαλες ζυμώσεις
- i. Πρόωρη οξίνιση γάλακτος – Οφείλεται στις τροφές και στον μεγάλο αριθμό οξυγαλακτικών βακτηρίων, αποτέλεσμα της ακάθαρτης συλλογής και τοποθέτησης του γάλακτος σε ακάθαρτα δοχεία, της κακής συντήρησης του γάλακτος σε υψηλή θερμοκρασία, της ενδεχόμενης νόσου του ζώου (χρόνια στρεπτοκοκκική μαστίτιδα).
 - ii. Αεριογόνες ζυμώσεις – Είναι συχνότερες το καλοκαίρι λόγω θερμοκρασίας άνω των 30 °C από την παρουσία ζυμομυκήτων, κλωστριδίων και κολοβακτηριοειδών. Το γάλα εμφανίζει χαρακτηριστικά αποσύνθεσης εκλύοντας CO₂, H₂ και μεθάνιο.
 - iii. Ιξώδη ζύμωση – Το γάλα παρουσιάζει ιξώδη εμφάνιση αμέσως μετά την έξοδό του από το μαστό του παραγωγικού ζώου ή μετά την πάροδο 12 h από τη στιγμή της άμελξης. Αιτίες αυτής της εμφάνισης μπορεί να είναι η συντήρηση του γάλακτος σε χαμηλές θερμοκρασίες, σταφυλοκοκκική ή

πυοβακίλλική μαστίτιδα λόγω αυξημένων λευκών αιμοσφαιρίων, παρουσία κολοβακτηριοειδών, οξυγαλακτικών και άλλων βακτηριακών στελεχών.

- iv. Γλυκιά πήξη – Παρουσιάζεται συχνότερα το καλοκαίρι λόγω συντήρησης του γάλακτος σε υψηλές θερμοκρασίες. Υπεύθυνα για την εμφάνισή της είναι ζυμομύκητες, ευρωτομύκητες, αερόβια σπορογόνα βακτήρια, μη σπορογόνα βακτήρια, όπως ο πρωτέας. Έτσι, το γάλα πήζει πριν αναπτυχθεί η κανονική του οξύτητα.
- v. Πρωτεολυτική ζύμωση – Όταν το γάλα διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία (10 °C) με παράλληλη παρουσία ζυμομυκήτων που προκαλούν ζύμωση λακτόζης, δημιουργείται πικρή γεύση του πηγματος λόγω παραγωγής πεπτονών. Συνοδεύεται από αποδόμηση των αδιάλυτων πρωτεϊνών του γάλακτος ή της κρέμας σε πεπτόνες, αμινοξέα, αμμωνία και άζωτο.
- vi. Αλκαλική ζύμωση – Υπεύθυνα για τη ζύμωση αυτή είναι βακτήρια ψευδομονάδων Gram αρνητικών που παράγουν αλκάλια και ανεβάζουν το pH.
- vii. Λιπολυτική ζύμωση – Οφείλεται στις ψυχρόφιλες ψευδομονάδες και σε κάποιους μύκητες που υδρολύουν το λίπος και δίνουν γεύση και οσμή ταγγού στο γάλα, το βούτυρο και την κρέμα.
- viii. Ζυμώσεις που αλλοιώνουν την οσμή – Η ανώμαλη οσμή μπορεί να προέλθει από το περιβάλλον (κοπριά, αντισηπτικά, εντομοκτόνα) ή από την κατανάλωση οσμηρών τροφών από το παραγωγικό ζώο (ενσιρωμένα τρόφιμα, τεύτλα). Οι οσμές των τροφίμων είναι εποχιακές και εξαρτώνται από το διατροφολόγιο και την ποσότητα λήψης. Επίσης, μπορεί να προέλθει από παθογόνες καταστάσεις, όπως είναι η μαστίτιδα, από την ηλιακή ακτινοβολία ή τα δοχεία συντήρησης του γάλακτος. Τέλος, μπορεί να οφείλεται στην παρουσία στο γάλα βακτηρίων, τα οποία αναπτύσσονται όταν απουσιάζουν τα οξυγαλακτικά.
- ix. Ζυμώσεις που αλλοιώνουν το χρώμα – Χρωμογόνα βακτήρια ή μύκητες ή κατανάλωση χρωστικών ή φυτών ή μαστίτιδες είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση του χρώματος του γάλακτος.
- x. Ζυμώσεις που αλλοιώνουν την γεύση – Η κατανάλωση πικρών τροφών, η ύπαρξη μαστίτιδας, ενδεχόμενες ανωμαλίες στο μεταβολισμό του ζώου και όταν το παραγωγικό ζώο βρίσκεται προς το τέλος της γαλακτικής περιόδου

επιδρούν στην αλλαγή της φυσιολογικής υπογλυκίζουσας γεύσης του γάλακτος.

6.4 Σωματικά κύτταρα γάλακτος

Τα σωματικά κύτταρα του γάλατος μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις τύπους: **(α)** λευκοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και εωσινόφιλα), **(β)** επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένος και **(γ)** κυτοπλασματικά σωματίδια. Η αναλογία μεταξύ των τριών αυτών τύπων μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου, από διάφορους παράγοντες και το είδος του ζώου (Pirisi et al 2007).

- Τα λευκοκύτταρα αποτελούνται κυρίως από τα μακροφάγα, τα πολυμορφοπύρηννα και τα λεμφοκύτταρα και με το μηχανισμό της κυτταροφαγίας (φαγοκυττάρωσης) καταστρέφουν μικρόβια και ξένες ουσίες που εισβάλλουν στον οργανισμό (Sordillo 2005). Τα μακροφάγα αντιπροσωπεύουν τον κύριο τύπο κυττάρων που απαντούν στο γάλα και στους ιστούς των υγιών μαστών (Rainard and Riollot 2003) και το ποσοστό τους ανέρχεται στο 46 - 84% των σωματικών κυττάρων (Paape et al 2007). Το ποσοστό των πολυμορφοπύρηννων ουδετερόφιλων κυττάρων (Polymorphonuclear Neutrophils - PMN) υπολογίζεται στο 2 - 28% (Cuccuru et al 2011) ή σύμφωνα με άλλους ερευνητές στο 10 - 35% (Bergonier and Berthelot 2003). Σε ότι αφορά τα λεμφοκύτταρα, το ποσοστό τους κυμαίνεται από 11 - 20% (Paape et al 2007) ή 10 - 17% (Bergonier et al 2003). Ο αριθμός των λευκοκυττάρων αυξάνει λόγω αντίδρασης σε περίπτωση βακτηριακών μολύνσεων, τραυματισμού του ιστού και καταπόνησης, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα προέρχονται από τον εκκριτικό ιστό του μαστού και αυξάνονται σε περιπτώσεις τραυματισμού ή λοίμωξης.
- Τα κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης αποτελούν το 2 - 3% των σωματικών κυττάρων στο πρόβειο γάλα (Bergonier and Berthelot 2003). Σύμφωνα με άλλους ερευνητές το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 1 - 2% (Paape et al 2007).
- Τα κυτοπλασματικά σωματίδια απαντούν στο γάλα των μικρών μηρυκαστικών, αλλά απουσιάζουν από το γάλα των αγελάδων. Στα μικρά μηρυκαστικά, η έκκριση του γάλατος από τα επιθηλιακά κύτταρα της κοιλότητας της αδενοκυψέλης είναι αποκρινούς φύσεως (έκκριση λιποσταγονιδίων). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διασπορά μεγάλου αριθμού κυτοπλασματικών σωματιδίων στο γάλα κατά την έκκρισή του. Αν και τα περισσότερα κυτοπλασματικά σωματίδια είναι απύρηννα, εντούτοις ορισμένα από αυτά έχουν πυρηνικά τμήματα, με αποτέλεσμα την αύξηση

του Αριθμού Σωματικών Κυττάρων (ΑΣΚ) (Bergonier and Berthelot 2003). Ο αριθμός τους στο πρόβειο γάλα ανέρχεται κατά μέσο όρο στα 15×10^3 / mL (Paape et al 2007).

Επισημαίνεται ότι γάλα που προέρχεται από υγιή μαστικό αδένά περιέχει μικρό αριθμό σωματικών κυττάρων, τα οποία συνήθως είναι μακροφάγα και λεμφοκύτταρα και λίγα μόνο είναι ουδετερόφιλα ή επιθηλιακά κύτταρα. Εάν ωστόσο μεταβληθεί η υγεία του μαστού λόγω μικροβιακής μόλυνσης, ο αριθμός και ο κυρίαρχος τύπος σωματικών κυττάρων υπόκεινται σε ταχεία μεταβολή τόσο στο πλήθος, όσο και στις αναλογίες των κυτταρικών τύπων (ο αριθμός υπερβαίνει τα 10^6 cfu/mL γάλακτος και στην πλειοψηφία τους ποσοστό >95% είναι ουδετερόφιλα). Η μεταβολή από μια υγιή, με χαμηλά σωματικά κύτταρα έκκριση γάλακτος, σε μια παθολογική έκκριση που περιέχει υψηλότερους αριθμούς σωματικών κυττάρων και πιθανόν θρόμβους, πραγματοποιείται μόνο σε λίγες ώρες (περίπου 48) και είναι μέρος των μηχανισμών φυσιολογικής αντίδρασης του ξενιστή (Kehrli and Shuster 1994).

6.4.1 Τροποποίηση του Αριθμού Σωματικών Κυττάρων (ΑΣΚ)

Η συγκέντρωση των σωματικών κυττάρων στο γάλα αποτελεί έναν έμμεσο τρόπο υπολογισμού του επιπέδου μόλυνσης του μαστικού αδένά των ζώων. Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων - Somatic Cell Count (SCC) χρησιμοποιείται σαν μέθοδος για τον καθορισμό των επιπέδων μαστίτιδας τόσο σε μεμονωμένα ζώα, όσο και σε δείγματα από την δεξαμενή γάλακτος, διότι υποδηλώνει εισβολή μικροοργανισμών στον μαστικό αδένά και την εκδήλωση φλεγμονώδους αντίδρασης σε αυτόν (Raynal-Ljutovac et al 2007). Η μέτρηση των σωματικών κυττάρων στο γάλα είναι γνωστή στη διεθνή βιβλιογραφία με τη συντομογραφία ΑΣΚ (Somatic Cell Count - SCC) και χρησιμοποιείται ως δείκτης της υγείας του μαστού καθώς και της σοβαρότητας της μαστίτιδας. Εκτός από τις περιπτώσεις ενδομαστικής λοίμωξης, ο ΑΣΚ (Somatic Cell Count - SCC) επηρεάζεται, αλλά σε μικρότερο βαθμό, και από άλλους μη λοιμογόνους παράγοντες όπως ο αριθμός της γαλακτικής περιόδου, το στάδιο της γαλακτικής περιόδου (Paape et al 2007, Haenlein 2002, Bergonier and Berthelot 2003, Luengo et al 2004), η φυλή (Leitner et al 2001, Paape et al 2007), η ποσότητα του παραγόμενου γάλακτος, το μέγεθος της τοκετοομάδας (Paape et al 2007, McDougall and Voermans 2002), η συχνότητα αρμέγματος (Nudda et al 2004a, Paape et al 2007), η μέθοδος αρμέγματος (Sinapis 2007) και η εποχικότητα (McDougall and Voermans 2002, Paape et al 2007). Σύμφωνα με τους Raynal-Ljutovac et al (2007), ο

αριθμός των γαλακτικών περιόδων και το στάδιο της γαλακτικής περιόδου είναι οι κύριοι μη παθογόνοι παράγοντες μεταβολής του ΑΣΚ (Somatic Cell Count - SCC).

Ύστερα από τα ανωτέρω αναφερόμενα πιστεύεται ότι με την σύγκριση του αριθμού των σωματικών κυττάρων μιας εκτροφής με ορισμένες τιμές αναφοράς, μπορεί να εντοπιστούν προβλήματα, να τεθούν στόχοι βελτίωσης καθώς και να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων ελέγχου μαστίτιδας και των διαχειριστικών πρακτικών που εφαρμόζονται (Kline et al 2018).

6.4.2 Καταμέτρηση του Αριθμού Σωματικών Κυττάρων (ΑΣΚ)

Η λήψη ατομικών δειγμάτων γάλακτος ανά ημιμόριο για τη καταμέτρηση του ΑΣΚ (Berthelot et al 2006), σε συνδυασμό με τη μικροβιολογική εξέταση (McDougall and Voermans 2002) μπορούν να αποτελέσουν ένα σημαντικό διαχειριστικό εργαλείο σε επίπεδο εκτροφής. Συνήθως η λήψη δειγμάτων γάλακτος από την παγολεκάνη δεν αποδίδει μια χαρακτηριστική εικόνα της υγείας των μαστών της εκτροφής, ιδιαίτερα αν τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων είναι αρνητικά.

Αρκετοί ερευνητές συμφωνούν στο ότι για να πληροί τις προδιαγραφές ποιότητας το αγελαδινό γάλα, πρέπει να έχει αριθμό σωματικών κυττάρων ΑΣΚ (SCC) έως 400.000 κύτταρα/mL. Όσον αφορά στο γάλα των αιγών και των προβάτων ο Κανονισμός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (852/2004) δεν ορίζει ανώτατο όριο σωματικών κυττάρων πάνω από το οποίο να θεωρείται ότι το γάλα προέρχεται από ζώα που πάσχουν από μαστίτιδα.

Επίσημα δεν υπάρχει Κανονισμός της Ευρωπαϊκής Ένωσης που να ορίζει ανώτατο όριο ΑΣΚ πάνω από το οποίο να θεωρείται ότι το γάλα προέρχεται από προσβεβλημένο ζώο. Στη διεθνή βιβλιογραφία, η πλειοψηφία των ερευνητών προτείνει για το διαχωρισμό μεταξύ υγιούς και προσβεβλημένου μαστού το όριο των 500×10^3 κυττάρων/mL (McDougall et al 2001, Paape et al 2007, Gonzalo et al 2002, Bergonier and Berthelot, 2003, Berthelot et al 2006). Στο παρελθόν, ορισμένοι συγγραφείς είχαν προτείνει ως ανώτερο όριο την τιμή των 1000×10^3 κυττάρων/mL (Mavrogenis et al 1995, Stefanakis et al 1995, Mavrogenis et al 1999).

Κατά καιρούς διάφοροι ερευνητές έχουν ορίσει αυθαίρετα ορισμένες τιμές ως ανώτατο όριο σωματικών κυττάρων. επικράτησε ο αριθμός 1.000.000 κύτταρα/mL χωρίς την επίσημη έγκριση από κάποιο Διεθνή Οργανισμό (Fthenakis et al 1991, Fthenakis 1995 Stefanakis et al 1995). Ωστόσο ερευνητές δηλώνουν ότι το γάλα που προέρχεται από υγιή ημιμόρια μαστού προβάτου, βρέθηκε ότι περιέχει λιγότερα από $0,5 \times 10^6$ κύτταρα/mL,

ενώ το γάλα που προέρχεται από ημιμόριο με υποκλινική μαστίτιδα περιέχει περισσότερα από $0,5 \times 10^6$ κύτταρα/mL καθώς και πάνω από 1.000 βακτήρια/mL. (Κοτανίδης 2003).

Γενικά είναι αποδεκτό, ότι δεν υπάρχει σαφές όριο του αριθμού σωματικών κυττάρων στο γάλα των προβάτων. Μελέτες αναφέρουν ότι τα επίπεδα σωματικών κυττάρων στο γάλα που προέρχεται από υγιή μαστό προβάτου μπορεί να φτάνουν τα 1.600.000 κύτταρα/mL ενώ αντίθετα ερευνητές υποστηρίζουν ότι το ανώτερο όριο σωματικών κυττάρων σε έναν υγιή μαστό είναι τα 250.000 κύτταρα/mL (Pengon 2001, Menzies 2000). Η ύπαρξη διαφορών μεταξύ φυλών ως προς την αύξηση των σωματικών κυττάρων και το βαθμό προσβολής του μαστού δημιουργεί την ανάγκη εξέτασης της πιθανότητας τήρησης διαφορετικών ορίων για τα σωματικά κύτταρα για κάθε φυλή ξεχωριστά. Όσον αφορά το γάλα των αιγών, θεωρείται ότι τα επίπεδα των σωματικών κυττάρων είναι υψηλότερα από εκείνα στο γάλα αγελάδων και προβάτων, με όριο σωματικών κυττάρων τα 1×10^6 κύτταρα/mL (Olechnowicz and Jaskowski 2004). Το όριο αυτό αναφέρεται ως ανώτερη ανεκτή τιμή στις ΗΠΑ και τη Γαλλία, παρόλο που συχνά αναφέρονται επίπεδα της κλίμακας των 300.000 – 400.000 κύτταρα/mL (Zamuner et al 2020).

Στην Ελλάδα με τη δημιουργία του Οργανισμού Γάλακτος, την κατασκευή διεπαγγελματικών εργαστηρίων σε αρκετές περιοχές και την Οδηγία της Κοινότητας 92/46, το όλο πλαίσιο για την παράμετρο του αριθμού των σωματικών κυττάρων στο γάλα είναι υπό αναμόρφωση.

Η ανωτέρω αναφερόμενη Οδηγία προβλέπει:

α) Για το νωπό αγελαδινό γάλα που προορίζεται για παρασκευή θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος (παστεριωμένο, UHT, αποστειρωμένο κ.λπ.), OMX < 100.000/mL και σωματικά κύτταρα < 400.000/mL, ενώ για την παρασκευή προϊόντων με βάση το γάλα (τυρί κ.λπ.) OMX < 400.000/mL και σωματικά κύτταρα 500.000/mL (μέχρι το 1998, μετά το 1998 θα ισχύουν τα όρια που ισχύουν για το θερμικά επεξεργασμένο γάλα),

β) Για το αιγοπρόβειο γάλα OMX < 1.000.000/mL (Οδηγία 92/46/ΕΟΚ, Καν. Ε.Κ. αριθ. 852/2004).

Η καταμέτρηση των σωματικών κυττάρων στο γάλα μπορεί να γίνει με άμεση μικροσκοπική μέθοδο ή και με τη χρήση της χρώσης μπλε του μεθυλενίου, η οποία συνιστάται τον International Dairy Federation (IDF) (IDF 1995) για τον εργαστηριακό προσδιορισμό του ΑΣΚ στο πρόβειο γάλα. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη, αλλά επίπονη και χρονοβόρα. Επιπλέον η καταμέτρηση μπορεί να γίνει με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μετρητή

σωματιδίων (Coulter Counter) ή τέλος με ηλεκτρονικό μετρητή σωματιδίων με την ανίχνευση του γενετικού υλικού (Fossomatic). Από τις τελευταίες δύο μεθόδους, που θεωρούνται αξιόπιστες και εύκολα πραγματοποιήσιμες, η μέτρηση με Fossomatic θεωρείται περισσότερο ακριβής, ιδιαίτερα προς το τέλος της γαλακτικής περιόδου που ο αριθμός των λιποσφαιριδίων αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό (Menzies and Ramanoon 2001, Gonzalo et al 2004).

Η χρησιμοποίηση του μετρητή Coulter προσμετρά πολλές φορές τα λιποσφαίρια ως σωματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να δίνει υψηλότερες τιμές από τις πραγματικές. Η μέτρηση πρέπει να γίνεται κατά το δυνατόν ταχύτερα από τη συλλογή του γάλακτος καθώς ο αριθμός των σωματικών κυττάρων μειώνεται κατά περίπου 14% από την πρώτη έως την έβδομη ημέρα συντήρησης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι πρέπει να τυποποιείται ο χρόνος και οι συνθήκες αποθήκευσης των δειγμάτων ώστε να μειωθεί η διακύμανση των Somatic Cell Count - SCC. Επιπλέον η κατάψυξη του υπό εξέταση δείγματος μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην καταμέτρηση.

Δοκιμή Καλιφόρνιας

Η έμμεση καταμέτρηση των σωματικών κυττάρων γίνεται με τις δοκιμές του Καλιφόρνια τεστ (California Mastitis test - CMT) και του Whiteside test. Οι δύο αυτές δοκιμές χρησιμοποιούνται ευρέως σε παγκόσμια κλίμακα για την ανίχνευση της υποκλινικής μαστίτιδας στα βοοειδή, επειδή είναι αξιόπιστες, εύκολες και φθηνές (Shitandi and Kihumbu 2004). Πολλοί ερευνητές όπως οι: Hueston et al 1986, Watkins et al 1991, Fthenakis 1995, υποστηρίζουν ότι οι δύο αυτές δοκιμές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ίδια επιτυχία για την ανίχνευση της υποκλινικής μαστίτιδας τόσο σε κρεατοπαραγωγά, όσο και σε γαλακτοπαραγωγά πρόβατα. Η δοκιμή του Καλιφόρνια τεστ επιτρέπει μια ημι-ποσοτική αξιολόγηση του ΑΣΚ, η οποία συνίσταται στην ανάμιξη γάλακτος με ίση ποσότητα αντιδραστήριου 3% λαουρυλοθειϊκού νατρίου, σε ειδικό σκεύος το οποίο αποτελείται από τέσσερις κυκλικούς υποδοχείς διαμέτρου 7,5 cm και βάθους 2 cm. Το σκεύος τοποθετείται κάτω από το μαστό και ακολουθεί η άμεγξη του προς εξέταση τεταρτημορίου ή ημιμορίου. Στη συνέχεια, προστίθεται το αντιδραστήριο και με κυκλικές κινήσεις αναμιγνύεται με το γάλα. Το αντιδραστήριο διαλύει το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των λευκοκυττάρων του γάλακτος, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του DNA του πυρήνα, με το οποίο αντιδρά, σχηματίζοντας πήγμα (Perrin et al 1997). Το αποτέλεσμα της αντίδρασης, δηλαδή ο σχηματισμός του πήγματος, βαθμολογείται και σχετίζεται με τον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο γάλα.

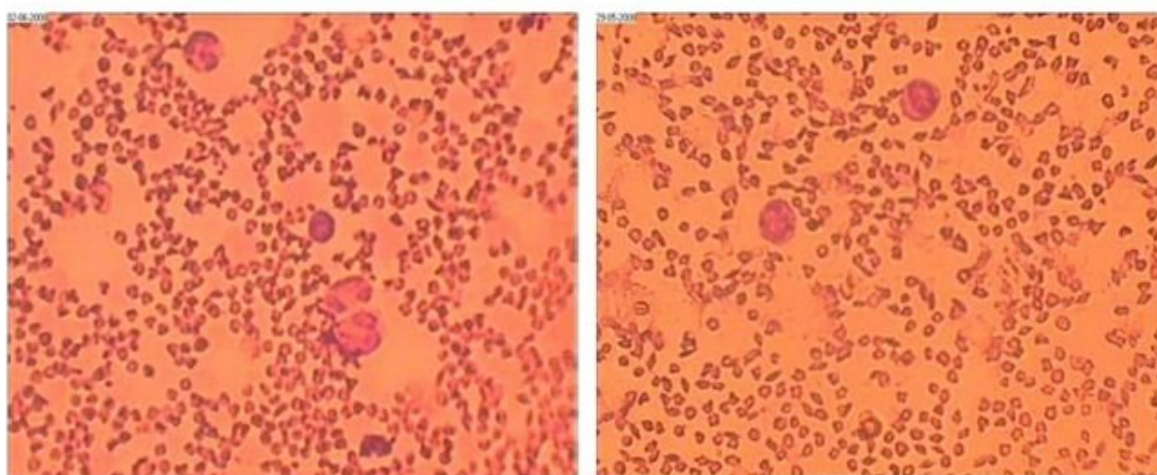
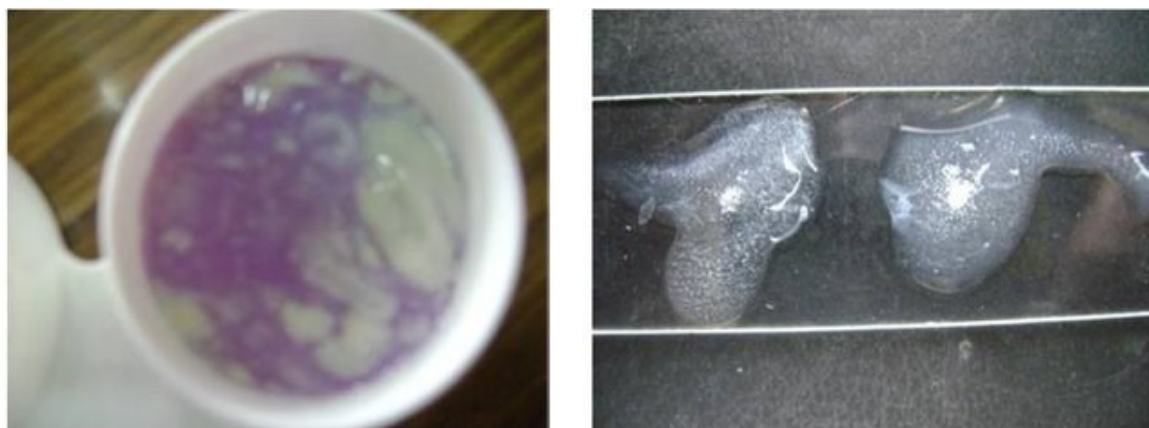
Με τη μεθοδολογία αυτή γίνεται επίσης και εκτίμηση του pH του γάλατος (Weihuan and Sandholm 1995). Το αποτέλεσμα της δοκιμής βαθμολογείται με έναν από τους πέντε βαθμούς αντίδρασης: «0», «1», «2», «3», «4», όπως περιγράφονται στον Πίνακα 10 (Schalm et al 1971, Tesfaye 2018) (Φωτογραφίες 2, 3 και 4).



Φωτογραφία 2: Σκεύος Καλιφόρνια τεστ (California Mastitis test - CMT).



Φωτογραφία 3: Διαβαθμίσεις αντιδράσεων στο Καλιφόρνια τεστ (California Mastitis test - CMT).



Φωτογραφία 4: Αντιστοίχιση αντιδράσεων στο Καλιφόρνια τεστ (California Mastitis test - CMT) και ηλεκτρονική μικροσκόπηση.

Πίνακας 10: Πρότυπο βαθμολογίας των αντιδράσεων στη δοκιμή Καλιφόρνιας.

Βαθμολόγηση	Εύρος τιμής του αριθμού των σωματικών κυττάρων κύτταρα/mL	Περιγραφή αντίδρασης
0	0 - 200.000	Καμία αλλαγή.
1	200.000 – 400.000	Μικρή κολλώδης μάζα, που παρατηρείται ευκρινέστερα στο λεπτό στρώμα υγρού στην περιφέρεια του υποδοχέα.
2	400.000 - 1.200.000	Μεγάλη κολλώδης μάζα, που δεν συγκεντρώνεται, καθώς το μίγμα ανακινείται.
3	1.200.000 - 5.000.000	Μεγάλη κολλώδης μάζα ή ημιστερεά πηκτή, που συγκεντρώνεται στο κέντρο του υποδοχέα ή κινείται ολόκληρη προς την περιφέρεια, καθώς το μίγμα ανακινείται.
4	↓ 5.000.000	Στερεά και κολλώδης πηκτή, που σχηματίζει ομοιογενή μάζα προσκολλημένη στον πυθμένα του υποδοχέα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ- ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής ήταν διτός:

(α1) Διερεύνηση και αξιολόγηση της ανίχνευσης των επιπέδων της αλκαλικής φωσφατάσης σε παστεριωμένο γάλα από τα ευρέως διαθέσιμα εμπορικά τεστ, τα πλεονεκτήματά τους και τα μειονεκτήματά τους, καθώς και η έρευνα-ανάπτυξη ενός απλού υπερευαίσθητου γρήγορου τεστ ανίχνευσης φωσφατάσης στο παστεριωμένο γάλα που θα απλοποιεί την διαδικασία ελέγχου και δεν θα επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες (θερμοκρασία περιβάλλοντος, υγρασία) και δεν θα περιορίζεται από χρήση συνοδού εξοπλισμού.

(α2) Την παροχή σημαντικών πληροφοριών για μία νέα συστηματική προσέγγιση των διαδικασιών του σωστού, έγκυρου ελέγχου παστερίωσης με σκοπό τη διασφάλιση της σωστής εκτέλεσης αυτού και απώτερο στόχο τη διασφάλιση της υγείας του καταναλωτή και την εξοικονόμηση εργατοωρών στις μονάδες επεξεργασίας και τυποποίησης γαλακτοκομικών προϊόντων.

(β) Να διερευνηθούν συσχετισμοί μεταξύ της εποχής συλλογής του γάλακτος, του συνολικού αριθμού μικροβίων και του αριθμού σωματικών κυττάρων του αγελαδινού γάλακτος ως δείκτες για την ποιότητα της υγιεινής αυτού και να δοκιμαστεί το νεοσύστατο kit SOMATOMIC ως εναλλακτικός τρόπος μέτρησης της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας και των ολικών σωματικών σε δείγματα κυττάρων νωπού γάλακτος. Η εύρεση ενός τέστ, που διαθέτει μικρό χρόνο πραγματοποίησης, ελάχιστο εξοπλισμό και ακριβή αποτελέσματα θα μπορούσε να δώσει νέα ώθηση στις διαχειριστικές πρακτικές των ποιμνίων και στην επίπτωση της μαστίτιδας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

8.1. ΥΛΙΚΑ

8.1.1. Δείγματα προς ανάλυση παστεριωμένου γάλακτος (Εικόνα 17)

Στην παρούσα μελέτη η συγκέντρωση στοιχείων και αποτελεσμάτων έγινε σε τέσσερεις (4) φάσεις, έτσι ώστε ή κάθε φάση να είναι φυσική απόρροια της προηγούμενης και να αποτελεί ασφαλιστική δικλείδα για την κατοχύρωση των δεδομένων που εξήχθησαν σε κάθε επόμενο στάδιο. Συνολικά, εξετάστηκαν πεντακόσια (500) δείγματα παστεριωμένου γάλακτος επί δύο (2) χρόνια, τα οποία προέρχονταν από 1250 εκτροφές προβάτων, αιγών και αγελάδων ορεινών και πεδινών περιοχών των Νομών Άρτας, Πρέβεζας, Αιτωλίας-Ακαρνανίας, Αχαΐας και Λάρισας. Τα ζώα των εν λόγω εκτροφών είναι διασταύρωση Ελληνικών φυλών όπως της Ορεινής φυλής Ηπείρου (τύπου Μπούτσικο, Λαΐο, Μπέλο), Αγρινίου, Σαρακατσάνικη και Καραμάνικη – Κατσικά, Φριζάρτα, Μηγάς, Χιώτικα, Ντόπια ελληνικά. Η γαλακτοπαραγωγή τους ανέρχεται στα 140 Kg / ζώο / έτος περίπου, ο δε αριθμός των ζώων ανά εκτροφή κυμαίνεται από 10 έως 80 ζώα.

Σημειώνεται ότι το γάλα που παραγόταν στις εκτροφές, στην πλειονότητά του δινόταν στις γαλακτοβιομηχανίες για τυροκόμηση, ενώ μια μικρότερη ποσότητα προοριζόταν για την παραγωγή παραδοσιακά παρασκευασμένων τυριών από τις οικογένειες των παραγωγών προς ίδια κατανάλωση.

Τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν στις παρακάτω ομάδες:

Α. Εκατό (100) δείγματα νωπού γάλακτος (τα οποία υποβλήθηκαν σε διαδικασία παστερίωσης) που συλλέχθηκαν από 100 εκτροφές κλινικά υγιών ζώων (προβάτων) ορεινών περιοχών του Νομού Αιτωλίας-Ακαρνανίας, δηλαδή ένα (1) δείγμα από κάθε εκτροφή το οποίο ελήφθη μία φορά ανά εκτροφή. **Ένα (1)** δείγμα πρόβειου νωπού γάλακτος, το οποίο ελήφθη τυχαία από μία (1) από τις εκτροφές για να παίξει το ρόλο του θετικού μάρτυρα και για να χρησιμοποιηθεί μέρος αυτού στα επιμέρους μίγματα παστεριωμένου με νωπό γάλα. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την λεπτομερή καταγραφή του ποιοτικού χρωματικού αποτελέσματος του νεοσυσταθέντος τεστ, το οποίο στη συνέχεια είναι το αντικείμενο έρευνας της παρούσης διατριβής και θα ονομάζεται τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» και την ανίχνευση του ορίου ευαισθησίας στην αλκαλική φωσφατάση σε μίγμα παστεριωμένου με νωπό γάλα σε διαφορετικές αναλογίες.

Β. Εκατό (100) δείγματα νωπού πρόβειου και γίδινου γάλακτος που συλλέχθηκαν από 100 εκτροφές προβάτων ορεινών περιοχών του Νομού Αιτωλίας-Ακαρνανίας, δηλαδή ένα (1) δείγμα από κάθε εκτροφή το οποίο ελήφθη μία φορά ανά εκτροφή. Τα δείγματα γάλακτος της ομάδας Β υποβλήθηκαν σε διαδικασία παστερίωσης και χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την εξακρίβωση των αποτελεσμάτων του τέστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ», με άλλη πιστοποιημένη και αποδεκτή στο εμπόριο μέθοδο ανίχνευσης φωσφατάσης σε παστεριωμένο γάλα. Η διαδικασία αυτή διήρκησε 30 ημέρες χωρισμένες σε ημερολογιακές ομάδες των πέντε (5) ημερών, όπου και πιστοποιήθηκε η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

Γ. Εκατό (100) δείγματα νωπού πρόβειου και γίδινου γάλακτος από τα ίδια ζώα της ομάδας Β που επεξεργάστηκαν με τη διαδικασία της παστερίωσης στην τυροκομική μονάδα Ν. ΝΑΚΑΣ & ΥΙΟΙ, Κάμπος Αμφιλοχίας – 30500/ Ελλάδα. Ένα (1) δείγμα πρόβειου νωπού γάλακτος το οποίο ελήφθη τυχαία από μία (1) από τις εκτροφές για να παίξει το ρόλο του θετικού μάρτυρα και για να χρησιμοποιηθεί μέρος αυτού στα επιμέρους μίγματα παστεριωμένου με νωπό γάλα. Τα δείγματα αυτά επέτρεψαν να γίνει συγκριτικός έλεγχος αντιπαράθεσης του τέστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» με το κιτ της εταιρείας HEYL LACTOGNOST III. Τα δείγματα λήφθηκαν από τις δεξαμενές T201 (50 δείγματα) και T202 (50 δείγματα) και η παστερίωση έγινε στον παστεριωτήρα NT50X.

Δ. Διακόσια (200) δείγματα παστεριωμένου πρόβειου, γίδινου και αγελαδινού γάλακτος από τέσσερις (4) διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδος με στοχευμένη ημερολογιακή δειγματοληψία για να εξεταστεί αν το ποιοτικό χρωματικό αποτέλεσμα του τέστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» και το όριο ευαισθησίας του επηρεάζεται από το είδος του γάλακτος, την εποχή μέτρησης, την ατμοσφαιρική υγρασία, τη θερμοκρασία περιβάλλοντος ή το είδος της τροφής των παραγωγικών ζώων.

Συγκεκριμένα:

- **Δ1.** Περιοχή Ήπειρος, μονάδα επεξεργασίας γάλακτος Β. ΤΕΦΑΣ – Ι. ΜΠΑΣΙΟΥΛΗ, Λεωφόρος Ιωαννίνων, Πρέβεζα. Πραγματοποιήθηκαν 5 στοχευμένες δειγματοληψίες παστεριωμένου πρόβειου και γίδινου γάλακτος ανά 10 δείγματα / δειγματοληψία κατά τις ημερομηνίες 01/11/2017, 06/02/2018, 26/06/2018, 18/10/2018, 14/02/2019.
- **Δ2.** Περιοχή Αχαΐα, τυροκομική μονάδα ΚΑΛΑΒΡΥΤΑ – ΧΕΛΜΟΣ, Σανταμέρι Αχαΐας. Πραγματοποιήθηκαν 3 στοχευμένες δειγματοληψίες παστεριωμένου πρόβειου και γίδινου γάλακτος ανά 10 δείγματα / δειγματοληψία κατά τις ημερομηνίες 29/02/2017, 16/01/2018, 07/06/2018.

- **Δ3.** Περιοχή Θεσσαλίας, τυροκομική μονάδα Ι. ΞΕΑΡΧΟΣ, Ελασσώνα Λάρισας. Πραγματοποιήθηκαν 6 στοχευμένες δειγματοληψίες παστεριωμένου πρόβειου, αγελαδινού και γίδινου γάλακτος ανά 10 δείγματα / δειγματοληψία κατά τις ημερομηνίες 29/02/2017, 10/03/2017, 31/08/2018, 29/09/2018, 17/10/2018, 05/02/2019.
- **Δ4.** Περιοχή Αιτωλίας-Ακαρνανίας, τυροκομική μονάδα Ν. ΝΑΚΑΣ & ΥΙΟΙ, Κάμπος Αμφιλοχίας. Πραγματοποιήθηκαν 6 στοχευμένες δειγματοληψίες παστεριωμένου πρόβειου και γίδινου γάλακτος ανά 10 δείγματα / δειγματοληψία κατά τις ημερομηνίες 28/02/2017, 14/03/2017, 14/07/2018, 28/09/2018, 15/10/2018, 07/02/2019.



Εικόνα 17: Συλλογή δειγμάτων.

8.1.2 Δείγματα προς ανάλυση νωπού γίδινου γάλακτος

Συλλέχθηκαν 17 δείγματα από ντόπιας φυλής κατσίκες, από την περιοχή Σαρδινίων Αμφιλοχίας. Τα δείγματα εξετάστηκαν σε εβδομαδιαία βάση κατά τη διάρκεια της πλήρους γαλουχίας, από τον Μάιο του 2019 έως τον Φεβρουάριο 2020. Μεμονωμένα πρωινά και βραδινά δείγματα αρμέγματος (συνολικά 800 δείγματα) εξετάστηκαν για ALP χρησιμοποιώντας τη νεοσύστατη μέθοδο της «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ», σε καθημερινή βάση (Δευτέρα έως Παρασκευή) για 8 εβδομάδες. Μεμονωμένα δείγματα γάλακτος ελέγχθηκαν για παρουσία θερμοσταθερής ALP.

Τα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης μετρήθηκαν σε νωπό γάλα από τις 17 ντόπιες κατσίκες της περιοχής Σαρδινίων Αμφιλοχίας. Από πρώιμο έως όψιμο θηλασμό με τη μέθοδο της «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ». Στους δύο πρώτους μήνες της μελέτης ελήφθησαν δείγματα πρωί και βράδυ από μεμονωμένες κατσίκες. Αποδόσεις από μεμονωμένες κατσίκες μετρήθηκαν σε όλη την περίοδο δειγματοληψίας. Οι κατσίκες που εξετάστηκαν κυμαίνονταν σε ηλικία από 1 έως 8 ετών. Γεννήσεις κατσικιών σε μεμονωμένες κατσίκες έλαβαν χώρα σε τακτά χρονικά διαστήματα τον Απρίλιο και τον Μάιο του 2019.

Οι μεμονωμένες κατσίκες παρήγαγαν από ένα έως τέσσερα νεογνά (ερίφια) και έντεκα από τις κατσίκες γέννησαν δίδυμα. Η κατσίκα νούμερο 16 έχασε και τα δύο ερίφια κατά τη γέννηση. Η δειγματοληψία των πρωινών δειγμάτων κατσικίσιου γάλακτος ξεκίνησε στις 30 Απριλίου 2019 και το βράδυ ελήφθησαν δείγματα γάλακτος για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εβδομάδας που άρχισε στις 7 Μαΐου 2019. Μεμονωμένα ζώα παρακολουθήθηκαν καθημερινά τον Μάιο, τον Ιούνιο και τον Ιούλιο του 2019.

Μέσες τιμές για ALP για μεμονωμένα πρωινά και απογευματινά δείγματα φαίνονται στους Πίνακες Δ6, Δ7, Δ8, Δ9, Δ10, Δ11, Δ12, Δ13, Δ14, Δ15, Δ16, Δ17, Δ18, Δ19, Δ20, Δ21, Δ22, Δ23, Δ24, Δ25, Δ26, Δ27, Δ28, Δ29 και Δ30.

Οι μέσες τιμές για την ALP στο πρωινό γάλα τον Μάιο κυμαίνονταν στα 5241,51 mU ALP/L στην κατσίκα 08 και 162812,7 mU ALP/L στην κατσίκα 016. Τα επίπεδα της ALP στην κατσίκα 16 εμφανίστηκαν ασυνήθιστα υψηλά σε σύγκριση με το υπόλοιπο κοπάδι. Η πλειοψηφία των αιγών είχε επίπεδα ALP μικρότερα από 16000 mU ALP/L.

Καθ' όλη τη διάρκεια του μήνα τα επίπεδα ALP διπλασιάστηκαν από τα φυσιολογικά επίπεδα για μία ή δύο ημέρες. Το χαμηλότερο επίπεδο που καταγράφηκε ήταν 5241,51 mU ALP/L (κατσίκα 08) και η υψηλότερη τιμή ήταν 28350,9 mU ALP/L (κατσίκα 17). Καθώς προχωρούσε η γαλουχία του Μαΐου τα επίπεδα ALP αυξήθηκαν. Σε αυτό το στάδιο

παρατηρήθηκε επίσης απόδοση του γάλακτος. Ωστόσο, σε μεμονωμένες κατσίκες υπήρχε κάποια μεταβλητότητα στα επίπεδα ALP.

Τα επίπεδα ALP ήταν υψηλότερα το βράδυ σε σύγκριση με το πρωινό γάλα. Στο γάλα της κατσίκας 14 παρατηρήθηκε το χαμηλότερο μέσο επίπεδο της ALP (7126,2 mU ALP/L) ενώ η υψηλότερη μέση τιμή καταγράφηκε για την κατσίκα 16 (218515,5 mU ALP/L). Τα επίπεδα ALP του γάλακτος της κατσίκας 16 ήταν και πάλι ασυνήθιστα υψηλά και το γάλα όλων των άλλων αιγών είχαν επίπεδα περίπου 10 φορές χαμηλότερα από αυτά της κατσίκας 16.

Οι αποδόσεις γάλακτος στα βραδινά δείγματα μειώθηκαν σημαντικά σε σύγκριση με τα πρωινά δείγματα. Οι μέσες τιμές για την ALP τον Ιούνιο κυμαίνονταν από 7099,2 mU ALP/L (κατσίκα 14) έως 383606,1 mU ALP/L (κατσίκα 16). Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα της ALP στο γάλα αυξάνονταν όσο προχωρούσε η γαλουχία. Οι μειωμένες αποδόσεις γάλακτος στα βραδινά δείγματα συσχετίστηκαν με αύξηση της συγκέντρωσης ALP στο γάλα. Μεμονωμένα ζώα παρακολούθηθηκαν σε εβδομαδιαία βάση, από τον Ιούλιο του 2019 έως τον Φεβρουάριο του 2020.

Καθώς προχωρούσε η γαλουχία, η απόδοση του γάλακτος μειώθηκε, ενώ το επίπεδο ALP στο γάλα αυξήθηκε. Οι συγκεντρώσεις ALP στο βραδινό γάλα αυξάνονταν καθώς οι αποδόσεις γάλακτος ήταν χαμηλές. Αν και οι συγκεντρώσεις της ALP αυξάνονται όσο η γαλουχία εξελίσσεται, υπήρξαν περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε ξαφνική ταχεία αύξηση της ALP. Το γεγονός αυτό ήταν εμφανές σε δείγματα γάλακτος από τις κατσίκες 02, 03, 05, 07, 09, 10, 12, 13 και 14. Η κατσίκα 16, στις οποίας το γάλα παρατηρήθηκαν σταθερά υψηλά επίπεδα ALP κατά τη διάρκεια της γαλουχίας της, πέθανε στα μέσα Αυγούστου.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής Electra m2 Unified Analyzer για να δομηθεί η καμπύλη μέτρησης 6 σημείων (linear point) της μεθόδου με το κιτ ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ, για να εξαχθούν ποσοτικές μετρήσεις της παρουσίας ALP στα δείγματα γάλακτος. Ακολουθήθηκαν οι χρόνοι επώασης με την προσθήκη R1, R2, R3 αντιδραστηρίων, καθώς και δείγματος στις ποσότητες που ακολουθήθηκαν στον ημιποσοτικό προσδιορισμό. Τα εξαγόμενα αποτελέσματα πιστοποιούν τη μέθοδο αντιπαραβολής που έγινε μεταξύ κιτ ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ και Lactognost Heyl. Ως βαθμονομητές χρησιμοποιήθηκαν επιμολυσμένα (spike) δείγματα με 3,5 mU/L ALP, 35 mU/L ALP, 70 mU/L, 140 mU/L ALP, 280 mU/L ALP, 560 mU/L ALP. Ως τυφλό (blank) χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια R1, R2, R3 και απιονισμένο νερό. Το μήκος κύματος για τη μέθοδο ήταν τα 340 nm.

Ο Μέσος όρος μεταβολής της φωσφατάσης του γάλακτος ανά κατσίκα φαίνεται στους Πίνακες: Δ31, Δ32, Δ33, Δ34, Δ35, Δ36, Δ37, Δ38, Δ39, Δ40, Δ41, Δ42, Δ43, Δ44, Δ45, Δ46, και Δ47.

8.1.3. Χημικά αντιδραστήρια

1. Το νεοσύστατο τέστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»
2. LACTOGNOST HEYL III (Εικόνα 18)
3. SENSObiz® - Biosensor System Test Kit - Alkaline Phosphatase Test (Εικόνα 19)
4. Αλκαλική φωσφατάση εταιρειών TCI Belgium και GLENTHAM UK



Εικόνα 18: LACTOGNOST HEYL III



Εικόνα 19: SENSObiz® - Biosensor System Test Kit - Alkaline Phosphatase Test.

8.1.4. Λοιπά υλικά

1. Στείροι πλαστικοί περιέκτες χωρητικότητας 150 mL
2. Δείκτες υγρής αποστείρωσης
3. Δείκτες ξηρής αποστείρωσης
4. Πιπέτες Pasteur 230 mm
5. Στείρες ευρύστομες φιάλες ή στείρα ποτήρια ζέσης χωρητικότητας 50-1000 mL κατασκευασμένες από βιοπυριτικό γυαλί.
6. Φιάλες αραίωσης με βιδωτό πώμα κατασκευασμένες από βιοπυριτικό γυαλί βαθμολογημένες για όγκο 100 mL - 1000 mL.
7. Σιφόνια, κατασκευασμένα από βιοπυριτικό γυαλί ή πλαστικά μιας χρήσης βαθμολογημένα και χωρητικότητας από 0,1 mL έως 11 mL.
8. Δοκιμαστικοί σωλήνες Φ16x160 mm και Φ16x100 mm κατασκευασμένοι από βιοπυριτικό γυαλί.
9. Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (BRAND 0,5 - 10 μl, 10 - 100 μl, 100 - 1000 μl)
10. Πλαστικά ρύγχη μιας χρήσης αποστειρωμένα, κίτρινα τύπου erpendorf για τις παραπάνω πιπέτες
11. Πώματα από υδρόφοβο βαμβάκι για γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες
12. Πουάρ
13. Λαβίδες ανοξείδωτες στείρες
14. Στατό μεταλλικά για γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες
15. Μετρητής της τιμής του pH εταιρείας Sentron
16. Αναδευτήρας τύπου Vortex
17. Ζυγός ακριβείας με ευαισθησία 0,0001 g
18. Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενη πλάκα
19. Υδατόλουτρο
20. Επωαστικός θάλαμος
21. Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής
22. Υγρός κλίβανος (αυτόκαυστο)
23. Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης
24. Ψυγεία
25. Στήλη απιονισμένου νερού
26. Μικροσκόπιο
27. Θολοσίμετρο
28. Αναλυτής Electra m2 Unified Analyzer

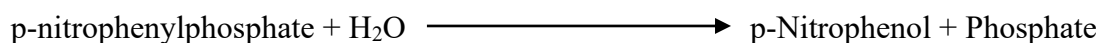
8.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΝΕΟΣΥΣΤΑΤΟΥ ΤΕΣΤ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»

Το τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής με βασικό γνώμονα την εφαρμογή ενός απλού υπερευαίσθητου γρήγορου τεστ ανίχνευσης αλακαλικής φωσφατάσης στο παστεριωμένο γάλα που θα απλοποιεί την διαδικασία ελέγχου και δεν θα επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες (π.χ. θερμοκρασία περιβάλλοντος, υγρασία) και δεν θα περιορίζεται από χρήση συγκεκριμένου συνοδού εξοπλισμού. Ταυτόχρονα, έγινε προσπάθεια για την μείωση του ορίου ευαισθησίας ανίχνευσης φωσφατάσης από τα 20 mU/L στα 3,5 mU/L.

Το τεστ αποτελείται από τρία (3) αντιδραστήρια που συντηρούνται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 2 - 8 °C και έχουν χρόνο λήξης από την ημερομηνία παρασκευής τους τα δύο (2) χρόνια. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται με τα τρία (3) αυτά αντιδραστήρια είναι η κινητική ενζυμική με χρωματογραφική απεικόνιση αποτελέσματος.

8.2.1. ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙ ΤΟ ΤΕΣΤ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»

Η αλκαλική φωσφατάση (ALP) καταλύει την υδρόλυση του p-nitrophenyl phosphate σε pH 10,4, απελευθερώνοντας p-nitrophenol και phosphate, σύμφωνα με την ακόλουθη χημική αντίδραση:



Το ποσοστό του p-Nitrophenol, χρωματικά αποτυπωμένο, είναι συμβατό με την καταλυτική συγκέντρωση της φωσφατάσης στο προς εξέταση δείγμα (με όριο ευαισθησίας 1,5 U/L) και ενισχύεται η ευαισθησία του ποσοστού αυτού από τον ενζυμικό καταλύτη που περιέχεται στο αντιδραστήριο R3 του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ».

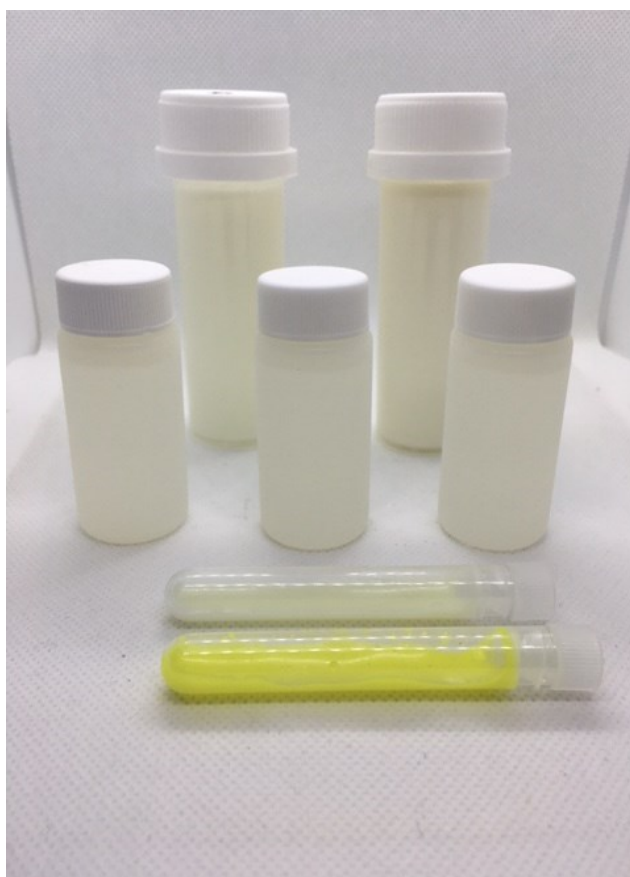
8.2.2 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»

Το κιτ Λακτοφωσφατάση (εικόνα 20) αποτελείται από τρία (3) επιμέρους αντιδραστήρια που η σύνθεσή τους είναι:

- **Αντιδραστήριο R1** [Διαιθανολαμίνη (DEA) < 200 mL/ L και Ιωδιούχος Άργυρος (AgI) < 5 g/ L].
- **Αντιδραστήριο R2** [π-νιτροφαινυλοφωσφορικό άλας (pNPP) < 20 g/ L].
- **Αντιδραστήριο R3** [Τρυψίνη < 2 ug/ L] και χρησιμοποιούνται σε όγκους 40, 10 και 5 mL αντίστοιχα.

8.2.3 ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΤΕΣΤ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»

Σε μεταλλικό ή πλαστικό στατό τοποθετούνται τόσα σωληνάρια όσα είναι και τα προς εξέταση δείγματα που θα ελεγχθούν από τον παστεριωτήρα και αριθμούνται. Με την πιπέτα μεταβλητού όγκου 100-1000 μl λαμβάνεται ποσότητα 400 μl από το αντιδραστήριο R1 και τοποθετείται στα σωληνάρια κατά αύξοντα αριθμό, αλλάζουμε ρύγχος, παραμετροποιούμε την ποσότητα που πρέπει να πάρουμε από τα 400 μl στα 100 μl και βάζουμε από το αντιδραστήριο R2 σε κάθε σωληνάριο. Στη συνέχεια, αλλάζουμε πιπέτα μεταβλητού όγκου και χρησιμοποιούμε την πιπέτα των 10-100 μl μαζί με το αντίστοιχο ρύγχος. Λαμβάνουμε 10 μl από το αντιδραστήριο R3 και το τοποθετούμε στα σωληνάρια. Τέλος, παίρνουμε την πιπέτα μεταβλητού όγκου 0,5 - 10 μl με νέο ρύγχος και βάζουμε σε κάθε σωληνάριο 8,3 μl από το δείγμα του προς εξέταση γάλακτος. Κλείνουμε το σωληνάριο είτε με υδρόφοβο βαμβάκι είτε με πλαστικό πώμα και ανακινούμε ελαφρώς το περιεχόμενο του σωληναρίου για 2-3 sec.



Εικόνα 20: Kit: R1 DEA, R2 p- nitrophenylphospate, R3 specific enzyme catalytc.

8.3 Τεχνική δειγματοληψίας ανά φάση εξέλιξης της έρευνας

Μαστικό έκκριμα παραγωγικών ζώων: Αρχικά αρμέγονταν τα παραγωγικά ζώα (πρόβατα, κατσίκες, αγελάδες) με το χέρι. Το γάλα συλλέγονταν σε στείρους περιέκτες των 150 mL και στη συνέχεια διενεργούνταν επιμελής ανάμειξή του για να εξασφαλισθεί ομοιογένεια σε ολόκληρη τη μάζα του δείγματος.

Μετά από τη δειγματοληψία, τα δείγματα τοποθετούνταν αμέσως σε φορητό ψυγείο και μεταφέρονταν στο εργαστήριο της κάθε τυροκομικής μονάδας, όπου επεξεργάζονταν και αναλύονταν την ίδια ημέρα. Όταν αυτό δεν ήταν εφικτό, διατηρούνταν σε θερμοκρασία 2-4°C, προκειμένου να αναλυθούν την επόμενη ημέρα.

Λήψη παστεριωμένου γάλακτος: Τα δείγματα του παστεριωμένου γάλακτος [δηλαδή σε χρόνο μηδέν (0) μετά το πέρας της διαδικασίας παστερίωσης] συλλέχθηκαν από τον παστεριωτήρα της κάθε τυροκομικής μονάδας άμεσα και με προσοχή με τη χρήση στείρων περιεκτών, χρήση αποστειρωμένων χειρουργικών γαντιών και μέσα προσωπικής χειρουργικής προστασίας για να αποφευχθεί επιμόλυνση του παστεριωμένου γάλακτος από τον χρήστη διότι η φωσφατάση είναι ένας δείκτης που βρίσκεται σε αφθονία στο περιβάλλον και η επιμόλυνση του δείγματος από εξωγενούς φύσεως φωσφατάση θα επηρέαζε τα αποτελέσματά μας.

Λήψη νωπού γάλακτος ως θετικό μάρτυρα: Από τα δείγματα που συλλέχθηκαν με μηχανικό τρόπο (άρμεγμα) επιλέχθηκε τυχαία ένα (1) δείγμα που έπαιξε το ρόλο του θετικού μάρτυρα κατά τη χρωματική απεικόνιση και αντιπαραβολή των τελικών δειγμάτων.

Λήψη νωπού γάλακτος ως ποσοστό φωσφατάσης σε παστεριωμένο γάλα: Από τα δείγματα που συλλέχθηκαν με μηχανικό τρόπο (άρμεγμα) επιλέχθηκε τυχαία ένα (1) δείγμα που έπαιξε το ρόλο της πηγής φωσφατάσης κατά την προσθήκη του με παστεριωμένο γάλα σε συγκεκριμένες αναλογίες.

8.3.1. Προετοιμασία δειγμάτων

8.3.1.1. Τεχνική χειρισμού και ομογενοποίησης των δειγμάτων ανά φάση εξέλιξης της έρευνας

Μαστικό έκκριμα παραγωγικών ζώων: Το κάθε δείγμα αναμειγνυόταν καλά μέσα στο φιαλίδιο δειγματοληψίας, με 20-25 αναστροφικές κινήσεις. Η ανακίνηση ήταν ταχεία και έντονη (25 αναστροφές σε χρόνο 7 sec). Το δείγμα αυτό και μέσα σε 3 min από τη στιγμή της ανακίνησης, τοποθετούνταν σε παγολεκάνες, οι οποίες είχαν απολυμανθεί επιμελώς και σύμφωνα με τα προβλεπόμενα πρότυπα απολύμανσης για την αποφυγή cross contamination από εξωγενή φωσφατάση ή μικροβιακό εξωγενές φορτίο.

Παστεριωμένο γάλα: Το κάθε δείγμα συλλέχθηκε με προσοχή από τον παστεριωτήρα και αναμειγνυόταν καλά μέσα στο φιαλίδιο δειγματοληψίας, με 20-25 αναστροφικές κινήσεις. Η ανακίνηση ήταν ταχεία και έντονη (25 αναστροφές σε χρόνο 7 sec). Από το δείγμα αυτό και μέσα σε 3 min από τη στιγμή της ανακίνησης, προχώρησε η διερεύνηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του δείγματος σε σχέση με το τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ».

Νωπό γάλα ως θετικός μάρτυρας: Το ένα (1) δείγμα αναμειγνυόταν καλά μέσα στο φιαλίδιο δειγματοληψίας, με 20-25 αναστροφικές κινήσεις. Η ανακίνηση ήταν ταχεία και έντονη (25 αναστροφές σε χρόνο 7 sec). Από το δείγμα αυτό και μέσα σε 3 min από τη στιγμή της ανακίνησης, λήφθηκαν με πιπέτα μεταβλητού όγκου 0,5 - 10 μl ποσότητα 8,3 μl και μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο για την διενέργεια του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ».

Νωπό γάλα ως ποσοστό φωσφατάσης σε παστεριωμένο γάλα: Το ένα (1) δείγμα αναμειγνυόταν καλά μέσα στο φιαλίδιο δειγματοληψίας, με 20-25 αναστροφικές κινήσεις. Η ανακίνηση ήταν ταχεία και έντονη (25 αναστροφές σε χρόνο 7 sec). Από το δείγμα αυτό και μέσα σε 3 min από τη στιγμή της ανακίνησης, λήφθηκαν με πιπέτα μεταβλητού όγκου ακριβείς ποσότητες νωπού γάλακτος, τόση κάθε φορά, ώστε να επιτευχθεί δημιουργία ποσότητας νέου δείγματος με αναλογία παστεριωμένου και νωπού γάλακτος:

- 0,001% νωπό γάλα σε παστεριωμένο γάλα ή ALP 3,5 mU/l
- 0,002% νωπό γάλα σε παστεριωμένο γάλα ή ALP 7 mU/l
- 0,005% νωπό γάλα σε παστεριωμένο γάλα ή ALP 17,5 mU/l
- 0,01% νωπό γάλα σε παστεριωμένο γάλα ή ALP 35 mU/l
- 0,02% νωπό γάλα σε παστεριωμένο γάλα ή ALP 70 mU/l
- 0,04% νωπό γάλα σε παστεριωμένο γάλα ή ALP 140 mU/l
- 0,06% νωπό γάλα σε παστεριωμένο γάλα ή ALP 210 mU/l
- 0,08% νωπό γάλα σε παστεριωμένο γάλα ή ALP 280 mU/l
- 0,1% νωπό γάλα σε παστεριωμένο γάλα ή ALP 350 mU/l *

*Στην Αγγλία οι απαρχαιωμένοι κανονισμοί για τον ειδικό καθορισμό του γάλακτος καθορίζουν ότι το παστεριωμένο γάλα πρέπει να ικανοποιεί το τεστ της υπολειπόμενης φωσφατάσης. Το προτεινόμενο τεστ ήταν το Aschaffenberg and Mullen τεστ (Lactognost Heyl III), σύμφωνα με το οποίο το γάλα είναι ικανοποιητικώς παστεριωμένο αν παράγει λιγότερα από 10 μg p-nitrophenol μέσα σε 2 h επωαστικής περιόδου. Αυτή η οδηγία αντικαταστάθηκε από επίσημη ευρωπαϊκή μέθοδο (Επιτροπή Αποφάσεων 91/180/EEC).

Το παστεριωμένο γάλα οφείλει να ικανοποιεί ακόμη και μετά από την αντικατάσταση των οδηγιών από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή τον έλεγχο φωσφατάσης βασισμένο στη μέθοδο Sanders and Sager (1946). Το γάλα που είναι ικανοποιητικός παστεριωμένο δεν πρέπει να απελευθερώνει περισσότερα από 4 ug φαινόλης μέσα σε 1 h επωαστικής περιόδου. Αυτή η μέθοδος δεν είναι περισσότερο ευαίσθητη σε σχέση με τη μέθοδο Aschaffenberg and Mullen και οι τιμές ορίων σε κάθε μέθοδο από τις 2 αντιπροσωπεύουν παρόμοιες δραστηριότητες φωσφατάσης από τη στιγμή που οι επωαστικές περίοδοι μεταξύ τους σχετίζονται (Bruce 2001). Και οι δύο (2) μέθοδοι έχουν το ίδιο όριο ευαισθησίας ίσο με το 0,1% ή 350 mU/L επιμόλυνσης με νωπό γάλα.

Ακολουθούσε έντονη ανακίνηση της φιάλης με το χέρι σε τόξο 30-35 cm επί 1 min. Η ομοιογενοποίηση του δείγματος γινόταν με τέτοιες αναλογίες, ώστε να προκύπτει επιμόλυνση του νέου δείγματος αναλογικά. Με αυτό τον τρόπο παρασκευάστηκαν τα νέα δείγματα που οδήγησαν στην συλλογή πληροφοριών για τα όρια ευαισθησίας ανίχνευσης επιπέδων φωσφατάσης και για την χρωματική απεικόνιση των δειγμάτων (εικόνες 21, 22 και 23).

8.3.1.2. Παρασκευή επιμολυσμένων με φωσφατάση νέων δειγμάτων

- Μετά την ομοιογενοποίηση του κάθε δείγματος και την παρασκευή των νέων επιμολυσμένων δειγμάτων, έγινε αρίθμηση των φιαλιδίων στην αντίστοιχη ποσοστιαία συγκέντρωση φωσφατάσης σε καθένα από αυτά δηλαδή 0,001%, 0,002%, 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,1%.
- Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας, αμέσως με την πρόσμιξη νωπού με παστεριωμένο γάλα, ανακινήθηκε με την χρήση κυκλομίκτη (Vortex).

Όλες οι προσμίξεις παρασκευάστηκαν εντός χρόνου 15 min από τη στιγμή της ομοιογενοποίησης του δείγματος.

8.3.1.3 Αναγνώριση των αποτελεσμάτων



Εικόνα 21: Τέστ LACTOGNOST HEYL III.



Εικόνα 22: SENSObiz® - Biosensor System Test Kit - Alkaline Phosphatase Test.



«Τεστ
ΛΑΚΤΟΦΩΣΓΑΤΑΣΗ»

«Τεστ SENSObiz®»

Εικόνα 23: «[Τεστ ΛΑΚΤΟΦΩΣΓΑΤΑΣΗ](#)» και SENSObiz® - Biosensor System Test Kit - Alkaline Phosphatase Test.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

9.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δίνονται μέσω συγκεντρωτικών πινάκων που απεικονίζουν:

- την ανίχνευση του ορίου ανίχνευσης ευαισθησίας φωσφατάσης σε επιμολυσμένο παστεριωμένο γάλα με 0,001%, 0,002%, 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,1% νωπό γάλα.
- την χρωματική απεικόνιση του πλήρως παστεριωμένου γάλακτος ως αρνητικό μάρτυρα, του νωπού γάλακτος ως θετικό μάρτυρα και των επί μέρους επιμολυσμένων δειγμάτων γάλακτος με 0,001%, 0,002%, 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,1% νωπό γάλα.
- την διερεύνηση της επαναληψιμότητας και σταθερότητας του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» σε διαφορετικά είδη γάλακτος από διαφορετικές πηγές προέλευσης γάλακτος (αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο) επί δύο (2) χρόνια και σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και διαφορετικές φυλές παραγωγικών ζώων
- την διερεύνηση του πιθανού συσχετισμού και της επίδρασης ατμοσφαιρικής υγρασίας, χρονικής περιόδου λήψης γάλακτος και παστερίωσης αυτού, θερμοκρασίας περιβάλλοντος στη χρωματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων
- συγκριτική μελέτη του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» με τη μέθοδο Aschaffenberg and Mullen (Lactognost Heyl III) και με το τεστ Sensobiz.

Οι πίνακες καταγράφουν τα αποτελέσματα κάθε φάσης του πειράματος ή κατά σειρά τις φάσεις Α, Β, Γ, Δ1, Δ2, Δ3, Δ4.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Χρωματική απεικόνιση θετικού και αρνητικού μάρτυρα (ΦΑΣΗ Α)

Είδος δείγματος	Αρνητικός μάρτυρας από πρόβειο γάλα (παστεριωμένο δείγμα)	Θετικός μάρτυρας από πρόβειο γάλα (νωπό γάλα)
Ποιοτικό χρωματικό αποτέλεσμα ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ	Λευκό χρώμα	Κιτρινοπράσινο χρώμα

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Ανίχνευση ορίου ευαισθησίας φωσφατάσης τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» σε παστεριωμένο γάλα (ΦΑΣΗ Α).

Θετικός μάρτυρας = κιτρινοπράσινο χρώμα (παρουσία φωσφατάσης στο δείγμα)

Αρνητικός μάρτυρας = λευκό χρώμα (απουσία φωσφατάσης στο δείγμα)

(0,1% = 350 mU/L)

Δείγμα: 101 δείγματα γάλακτος (το ένα – 1 – δείγμα νωπού γάλακτος έπαιξε το ρόλο του θετικού μάρτυρα για την επιμόλυνση των παστεριωμένων δειγμάτων με αυτό).

Το τεστ πραγματοποιήθηκε στην τυροκομική μονάδα Ν. ΝΑΚΑΣ & ΥΙΟΙ, Κάμπος Αμφιλοχίας, Ελλάδα στις 26/01/2017.

% νωπό γάλα σε παστεριωμένο γάλα	Αριθμός δειγμάτων	Ποιοτικό χρωματικό αποτέλεσμα τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»	Χρονικό διάστημα απεικόνισης του χρωματικού αποτελέσματος
0,00% ή φωσφατάση μη ανιχνεύσιμη	10	Λευκό χρώμα	5 sec
0,001% ή φωσφατάση 3,5 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα	5 sec
0,002% ή φωσφατάση 7 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα	5 sec
0,005% ή φωσφατάση 17,5 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα	5 sec
0,01% ή φωσφατάση 35 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα	5 sec
0,02% ή φωσφατάση 70 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα	5 sec
0,04% ή φωσφατάση 140 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα	5 sec
0,06% ή φωσφατάση 210 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα	5 sec
0,08% ή φωσφατάση 280 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα	5 sec
0,1% ή φωσφατάση 350 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα	5 sec

Από την φάση Α βρέθηκε ότι το όριο ευαισθησίας ανίχνευσης φωσφατάσης στο παστεριωμένο γάλα με τη μέθοδο του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» είναι 3,5 mU/ L.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Επαναληψιμότητα και σταθερότητα αποτελεσμάτων επί τριάντα (30) ημέρες σε συνάρτηση με άλλη πιστοποιημένη μέθοδο ανίχνευσης φωσφατάσης σε παστεριωμένο γάλα (ΦΑΣΗ Β).

Όλα τα παστεριωμένα δείγματα επεξεργάστηκαν στην τυροκομική μονάδα Ν. ΝΑΚΑΣ & ΥΙΟΙ, Κάμπος Αμφιλοχίας, Ελλάδα από 01/01/2017 μέχρι 30/01/2017.

Δείγμα: 100 δείγματα παστεριωμένου γάλακτος

Πρωτόκολλο παστερίωσης: Στους 70 °C, με χρόνο παστερίωσης 15 sec και χρόνο αναμονής 15 min στον βραστήρα.

Χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αντιπαράθεσης για τη σωστή παστερίωση kit της εταιρείας Heyl Lactognost III (Aschaffenberg and Mullen μέθοδος).

Σωστή παστερίωση για τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»: Λευκό χρώμα

Σωστή παστερίωση για τεστ Lactognost Heyl III: Λευκό-καφέ χρώμα

Ημερομηνία	Αριθμός δειγμάτων	Θερμοκρασία παστερίωσης	Χρόνος παστερίωσης	Χρόνος αναμονής	Αποτέλεσμα εσωτερικού ελέγχου παστερίωσης	τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»	LACTOGNOST HEYL III, Lot No: 110102
01/01/2017-05/01/2017	16	70 °C	15 sec	15 min	Έγκριση – σωστή παστερίωση	Λευκό χρώμα	Λευκό-καφέ χρώμα
06/01/2017-10/01/2017	16	70 °C	15 sec	15 min	Έγκριση – σωστή παστερίωση	Λευκό χρώμα	Λευκό-καφέ χρώμα
11/01/2017-15/01/2017	16	70 °C	15 sec	15 min	Έγκριση – σωστή παστερίωση	Λευκό χρώμα	Λευκό-καφέ χρώμα
16/01/2017-20/01/2017	17	70 °C	15 sec	15 min	Έγκριση – σωστή παστερίωση	Λευκό χρώμα	Λευκό-καφέ χρώμα
21/01/2017-25/01/2017	17	70 °C	15 sec	15 min	Έγκριση – σωστή παστερίωση	Λευκό χρώμα	Λευκό-καφέ χρώμα
26/01/2017-30/01/2017	18	70 °C	15 sec	15 min	Έγκριση – σωστή παστερίωση	Λευκό χρώμα	Λευκό-καφέ χρώμα

Από τη φάση Β εξάγεται το συμπέρασμα ότι το τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» δίνει σωστά επαναλαμβανόμενα και σταθερά αποτελέσματα σε βάθος χρόνου τριάντα (30) ημερών και η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων αυτών πιστοποιείται και με τη μέθοδο Aschaffenberg and Mullen.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Συγκριτικός έλεγχος αντιπαράθεσης τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» – HEYL LACTOGNOST III για επαλήθευση ορίων ευαισθησίας ανίχνευσης φωσφατάσης στο LACTOPAST (ΦΑΣΗ Γ).

Δείγμα: 101 δείγματα γάλακτος (το ένα – 1 – δείγμα νοπού γάλακτος έπαιξε το ρόλο του θετικού μάρτυρα για την επιμόλυνση των παστεριωμένων δειγμάτων με αυτό).

Το τεστ πραγματοποιήθηκε στην τυροκομική μονάδα Ν. ΝΑΚΑΣ & ΥΙΟΙ, Κάμπος Αμφιλοχίας, Ελλάδα στις 26.01.2017. Τα 100 δείγματα παστεριωμένου πρόβειου γάλακτος (η διαδικασία παστερίωσης έγινε στον παστεριωτήρα NT50X) ελήφθησαν από τις δεξαμενές T201 (50 δείγματα) και T202 (50 δείγματα) μαζί με το αντίστοιχο 1 δείγμα νοπού πρόβειου γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε σε επιμολύνσεις των παστεριωμένων δειγμάτων σε συγκεντρώσεις 0,001%, 0,002%, 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,1%.

Το ένα (1) δείγμα νοπού πρόβειου γάλακτος παίζει το ρόλο του θετικού μάρτυρα με κιτρινοπράσινο χρώμα (παρουσία φωσφατάσης στο δείγμα).

Το ένα (1) δείγμα παστεριωμένου πρόβειου γάλακτος που δεν υπέστη πρόσμιξη με νοπό πρόβειο γάλα, παίζει το ρόλο του αρνητικού μάρτυρα με λευκό χρώμα (απουσία φωσφατάσης στο δείγμα).

Χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αντιπαράθεσης για τη σωστή παστερίωση και της εταιρείας Heyl Lactognost III, με αριθμό παρτίδας εργοστασιακής παραγωγής 110102.

Σωστή παστερίωση για τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»: Λευκό χρώμα

Προβληματική παστερίωση για τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»: Κιτρινοπράσινο χρώμα

Σωστή παστερίωση για Lactognost Heyl III: Λευκό-καφέ χρώμα

Προβληματική παστερίωση για τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»: Άνοικτο πράσινο χρώμα

% νωπό γάλα σε παστεριωμένο γάλα	Αριθμός δειγμάτων	Ποιοτικό αποτέλεσμα «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» (σε προσδιορισμό)	χρωματικό τεστ χρονικό (σε προσδιορισμό)	Ποιοτικό αποτέλεσμα Lactognost III, Lot No: 110102 (σε προσδιορισμό)	χρωματικό Heyl No: (σε προσδιορισμό)
0,00% ή φωσφατάση μη ανιχνεύσιμη	10	Λευκό χρώμα/ 5 sec		Λευκό-καφέ χρώμα/ 3600 sec	
0,001% ή φωσφατάση 3,5 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα/ 5 sec		Λευκό-καφέ χρώμα/ 3600 sec	
0,002% ή φωσφατάση 7 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα/ 5 sec		Λευκό-καφέ χρώμα/ 3600 sec	
0,005% ή φωσφατάση 17,5 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα/ 5 sec		Λευκό-καφέ χρώμα/ 3600 sec	
0,01% ή φωσφατάση 35 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα/ 5 sec		Λευκό-καφέ χρώμα/ 3600 sec	
0,02% ή φωσφατάση 70 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα/ 5 sec		Λευκό-καφέ χρώμα/ 3600 sec	
0,04% ή φωσφατάση 140 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα/ 5 sec		Λευκό-καφέ χρώμα/ 3600 sec	
0,06% ή φωσφατάση 210 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα/ 5 sec		Λευκό-καφέ χρώμα/ 3600 sec	
0,08% ή φωσφατάση 280 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα/ 5 sec		Λευκό-καφέ χρώμα/ 3600 sec	
0,1% ή φωσφατάση 350 mU/L	10	Κιτρινοπράσινο χρώμα/ 5 sec		Άνοικτο πράσινο χρώμα/ 3600 sec	

Λαμβάνοντας υπόψη τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης φωσφατάσης στο παστεριωμένο γάλα για το τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» στα 3,5 mU/L και διαβάζοντας το εσώκλειστο του τεστ Heyl Lactognost III ότι ανιχνεύει όρια φωσφατάσης στο παστεριωμένο γάλα από 0,1% ή 350 mU/L εξάγεται το συμπέρασμα ότι το όριο ανίχνευσης των 3,5 mU/L καθιστά το τεστ ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ το πιο ευαίσθητο τεστ παγκοσμίως και κοντά στις ιδανικές συνθήκες του 0% φωσφατάσης σε παστεριωμένο γάλα.

9.2 ΔΙΑΚΡΙΒΩΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ»

Τέλος, έπρεπε να διευκρινιστεί η συμπεριφορά της μεθόδου του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» σε σχέση με:

- επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων
- σταθερότητα αποτελεσμάτων
- γεωγραφικό εύρος
- κλιματικές αλλαγές
- θερμοκρασία περιβάλλοντος
- διαφορετικό είδος προέλευσης γάλακτος
- διαφορετικά πρότυπα παστερίωσης
- χρονική περίοδο παστερίωσης

Έτσι, η τέταρτη φάση ή αλλιώς Δ, πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα διαφορετικά γεωγραφικά μέρη της Ελλάδος, για δύο (2) έτη, με ποικιλία παρεχόμενου γάλακτος (αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο), διαφορετικά πρωτόκολλα παστερίωσης και δειγματοληπτικές λήψεις - επεξεργασία αποτελεσμάτων όλες τις εποχές του χρόνου σε θερμοκρασιακό εύρος εκτέλεσης του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» από 2 °C μέχρι 42 °C. Η φάση Δ χωρίστηκε σε τέσσερις (4) υποκατηγορίες:

- Δ1 περιοχή Ηπείρου από 01/11/2017 μέχρι 14/02/2019. Τα δείγματα γάλακτος που συλλέχθηκαν για εξέταση της μεθόδου τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» ήταν από κοπάδια αιγών και προβάτων, χρησιμοποιήθηκαν 50 συνολικά δείγματα (από εκτροφές των Νομών Πρεβέζης και Άρτας) και η επεξεργασία έγινε στη μονάδα επεξεργασίας γάλακτος Β. ΤΕΦΑΣ – Ι. ΜΠΑΣΙΟΥΛΗ, Λεωφόρος Ιωαννίνων, Πρέβεζα (ΠΙΝΑΚΑΣ Δ1).

- Δ2 περιοχή Αχαΐας από 29/02/2017 μέχρι 07/06/2018. Τα δείγματα γάλακτος που συλλέχθηκαν για εξέταση της μεθόδου τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» ήταν από κοπάδια αιγών και προβάτων, χρησιμοποιήθηκαν 30 συνολικά δείγματα (από εκτροφές του νομού Αχαΐας) και η επεξεργασία έγινε στην τυροκομική μονάδα ΚΑΛΑΒΡΥΤΑ-ΧΕΛΜΟΣ, Σανταμέρι Αχαΐας (ΠΙΝΑΚΑΣ Δ2).
- Δ3 περιοχή Θεσσαλίας από 29/02/2017 μέχρι 05/02/2018. Τα δείγματα γάλακτος που συλλέχθηκαν για εξέταση της μεθόδου τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» ήταν από κοπάδια αιγών, αγελάδων και προβάτων, χρησιμοποιήθηκαν 60 συνολικά δείγματα (από εκτροφές του νομού Λάρισας) και η επεξεργασία έγινε στην τυροκομική μονάδα Ι. ΕΞΑΡΧΟΣ, Ελασσώνα Λάρισας (ΠΙΝΑΚΑΣ Δ3).
- Δ4 περιοχή Αιτωλίας-Ακαρνανίας από 28/02/2017 μέχρι 07/02/2019. Τα δείγματα γάλακτος που συλλέχθηκαν για εξέταση της μεθόδου τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» ήταν από κοπάδια αιγών και προβάτων, χρησιμοποιήθηκαν 60 συνολικά δείγματα (από εκτροφές του νομού Αιτωλίας-Ακαρνανίας) και η επεξεργασία έγινε στην τυροκομική μονάδα Ν. ΝΑΚΑΣ & ΥΙΟΙ, Κάμπος Αμφιλοχίας (ΠΙΝΑΚΑΣ Δ4).

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ1: Αποτελέσματα ελέγχου παστερίωσης με τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» στην Ήπειρο.

Περιοχή	Ημερομηνία	Είδος γάλακτος	Αριθμός δειγμάτων	% Σωστό αποτέλεσμα παστερίωσης επί των δειγμάτων	Θερμοκρασία περιβάλλοντος (σε °C)
ΗΠΕΙΡΟΣ	01/11/2017	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	16,9
ΗΠΕΙΡΟΣ	06/02/2018	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	17,8
ΗΠΕΙΡΟΣ	26/06/2018	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	36,0
ΗΠΕΙΡΟΣ	18/10/2018	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	17,0
ΗΠΕΙΡΟΣ	14/02/2019	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	9,8

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ2: Αποτελέσματα ελέγχου παστερίωσης με τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» στην Αχαΐα.

Περιοχή	Ημερομηνία	Είδος γάλακτος	Αριθμός δειγμάτων	% Σωστό αποτέλεσμα παστερίωσης επί των δειγμάτων	Θερμοκρασία περιβάλλοντος (σε °C)
ΑΧΑΪΑ	29/02/2017	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	20,0
ΑΧΑΪΑ	16/01/2018	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	20,0
ΑΧΑΪΑ	07/06/2018	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	29,8

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ3: Αποτελέσματα ελέγχου παστερίωσης με τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» στην Θεσσαλία.

Περιοχή	Ημερομηνία	Είδος γάλακτος	Αριθμός δειγμάτων	% Σωστό αποτέλεσμα παστερίωσης επί των δειγμάτων	Θερμοκρασία περιβάλλοντος (σε °C)
ΘΕΣΣΑΛΙΑ	29/02/2017	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ, ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	10	100%	18,3
ΘΕΣΣΑΛΙΑ	10/03/2017	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ, ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	10	100%	16,2
ΘΕΣΣΑΛΙΑ	31/08/2018	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ, ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	10	100%	27,5
ΘΕΣΣΑΛΙΑ	29/09/2018	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ, ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	10	100%	19,7
ΘΕΣΣΑΛΙΑ	17/10/2018	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ, ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	10	100%	25,5
ΘΕΣΣΑΛΙΑ	05/02/2019	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ, ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	10	100%	9,8

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ4: Αποτελέσματα ελέγχου παστερίωσης με τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» στην Αιτωλία-Ακαρνανία.

Περιοχή	Ημερομηνία	Είδος γάλακτος	Αριθμός δειγμάτων	% Σωστό αποτέλεσμα παστερίωσης επί των δειγμάτων	Θερμοκρασία περιβάλλοντος (σε °C)
ΑΙΤΩΛΙΑ-ΑΚΑΡΝΑΝΙΑ	28/02/2017	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	17,9
ΑΙΤΩΛΙΑ-ΑΚΑΡΝΑΝΙΑ	14/03/2017	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	10,8
ΑΙΤΩΛΙΑ-ΑΚΑΡΝΑΝΙΑ	14/07/2018	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	42,0
ΑΙΤΩΛΙΑ-ΑΚΑΡΝΑΝΙΑ	28/09/2018	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	19,7
ΑΙΤΩΛΙΑ-ΑΚΑΡΝΑΝΙΑ	15/10/2018	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	22,7
ΑΙΤΩΛΙΑ-ΑΚΑΡΝΑΝΙΑ	05/02/2019	ΠΡΟΒΕΙΟ, ΓΙΔΙΝΟ	10	100%	16,7

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ5: Στοιχεία αιγών που έλαβαν μέρος στην δειγματοληψία.

Κωδικός Κατσίκας (ID)	Ηλικία (χρόνια)	Ημερομηνία γέννησης νεογνών	Αριθμός νεογνών
01	4	10/4/19	2
02	4	8/4/19	4
03	4	7/4/19	2
04	4	6/4/19	2
05	3	10/4/19	2
06	2	12/4/19	2
07	8	4/4/19	2
08	7	9/4/19	1
09	7	9/4/19	1
10	6	11/4/19	1
11	8	28/4/19	1
12	7	29/4/19	2
13	2	30/4/19	2
14	4	30/4/19	2
15	1	17/5/19	2
16	8	11/5/19	2 (θάνατοι κατά την γέννηση)
17	7	21/5/19	2

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ6: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα πρωινά δείγματα κατσικίσιου γάλακτος τον Μάιο του 2019.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	20	8760,6	8172	2564,1	405,9	6390	18639	7159,5	9293,4
02	4	20	5442,3	5553	1069,2	169,2	3870	8293,5	4405,5	5998,5
03	4	20	7899,3	8284,5	1355,4	214,2	5170,5	9742,5	6538,5	9040,5
04	4	20	9060,3	9009	1870,2	295,2	6309	12330	7339,5	10839,6
05	3	20	9940,5	8523	4218,3	666,9	6309	24102	8068,5	10002,6
06	2	20	7522,2	7375,5	3786,3	598,5	3721,5	23188,5	5192,1	8481,6
07	8	20	15290,1	13198,5	9416,7	1488,6	9351	54157,5	11146,5	15286,5
08	7	20	5241,51	5170,5	563,31	89,1	4342,5	6993	4860	5544
09	7	20	7981,2	8523	2332,8	369	4491	15372	5773,5	9004,5
10	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	8	16	18134,1	19321,2	8581,5	1517,4	5935,5	34753,5	9242,1	21204,9
12	7	19	20857,5	11905,2	23917,5	3879,9	7447,5	99855	9101,7	16430,4
13	2	19	14979,6	10303,2	11822,4	1917,9	5256	48987	6578,1	18386,1
14	4	19	11134,8	6421,5	11513,7	1867,5	3267	48987	4180,5	13171,5
15	1	4	11255,4	10870,2	2457	868,5	8356,5	15142,5	9220,5	13575,6
16	8	8	162812,7	134152	71543,7	17885,7	83286	332640	111242,7	200047,5
17	7	7	28350,9	15484,5	20747,7	5544,9	12100,5	71802	12602,7	40769,1

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ7. Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα βραδινά δείγματα κατσικίσιου γάλακτος τον Μάιο του 2019.

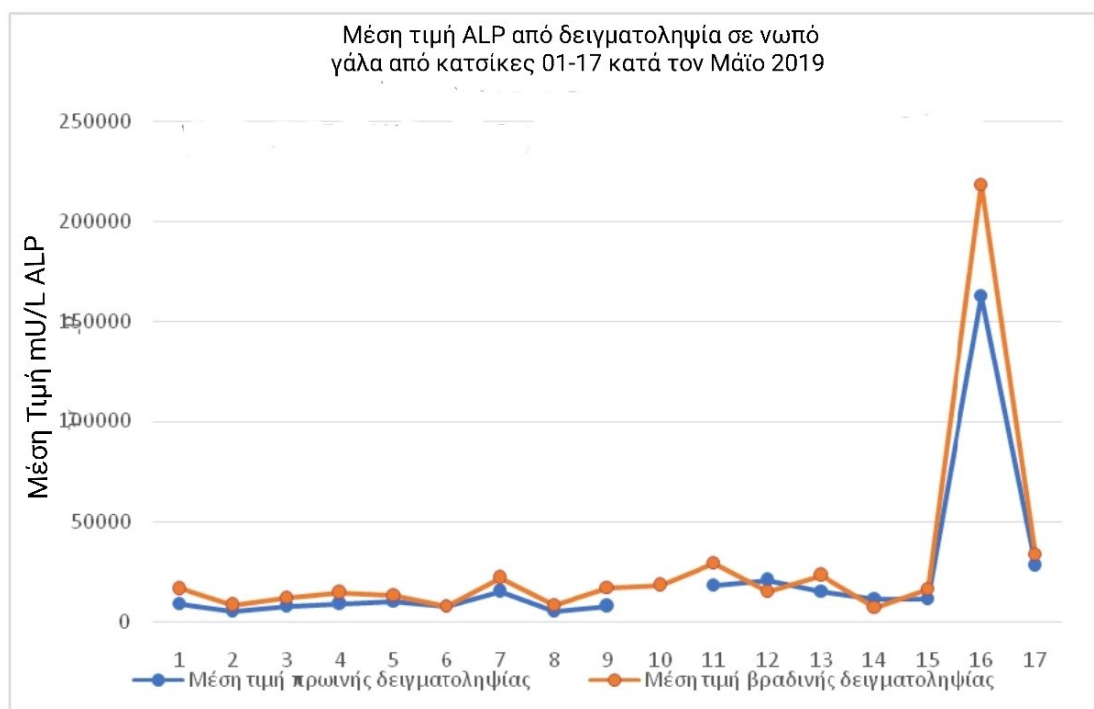
Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	12	16665,3	16321,5	5688,9	1161	7614	26685	11586,6	21960
02	4	12	8527,5	8212,5	1840,5	375,3	6538,5	13837,5	7447,5	8860,5
03	4	12	11780,1	11596,5	1812,6	369,9	9351	16713	10492,2	12707,1
04	4	12	14759,1	14139	2201,4	449,1	11565	19341	13296,6	16167,6
05	3	12	13155,3	13725	2628,9	536,4	9207	18702	10709,1	14904
06	2	12	7490,7	7033,5	1334,7	272,7	5773,5	10593	6406,2	8420,4
07	8	12	22028,4	21100,5	5466,6	1116	15741	38106	18810	23335,2
08	7	12	8384,4	7571,7	2196	448,2	6165	15061,5	7216,2	8711,1
09	7	12	16932,6	14098,5	9585	1956,6	12163,5	48987	13149,9	15614,1
10	6	12	18459	17802	2843,1	580,5	14832	25402,5	16155,9	20304
11	8	12	29232,9	30420	12492,9	2549,7	10570,5	52938	15829,2	37219,5
12	7	12	15195,6	14254,2	4322,7	882	9805,5	27535,5	12330	16946,1
13	2	12	23400,9	13498,2	18693	3816	7384,5	62599,5	10262,7	38705,4
14	4	12	7126,2	6010,2	2802,6	572,4	4405,5	14958	5283,9	8046
15	1	7	16162,2	13498,2	3774,6	1008,9	12555	21969	13095	20396,7
16	8	7	218515,5	180405	89881,2	24021,9	119317,5	374445	151315,2	324619,2
17	7	6	33439,5	17685	25263	7292,7	14458,5	76437	16542,9	58480,2

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ8: Μέσος όρος τιμής ALP πρωινής και βραδινής δειγματοληψίας Μαΐου 2019.

Αριθμος Κατσίκας	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
01	8760,6	16665,3
02	5442,3	8527,5
03	7899,3	11780,1
04	9060,3	14759,1
05	9940,5	13155,3
06	7522,2	7490,7
07	15290,1	22028,4
08	5241,51	8384,4
09	7981,2	16932,6
10	-	18459
11	18134,1	29232,9
12	20857,5	15195,6
13	14979,6	23400,9
14	11134,8	7126,2
15	11255,4	16162,2
16	162812,7	218515,5
17	28350,9	33439,5



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ9. Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα πρωινά δείγματα κατσικίσου γάλακτος τον Ιούνιο του 2019.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	19	18127,8	17707,5	7486,2	1717,2	560,7	35766	14843,7	21526,2
02	4	19	9778,5	9558	3598,2	825,3	477	17458,2	7717,5	12172,5
03	4	19	12468,6	11614,5	3961,8	909	9828	28206	10735,2	12577,5
04	4	19	14192,1	13322,7	2551,5	585,9	11295	19694,7	12526,2	14956,2
05	3	19	17646,3	18297	4463,1	1024,2	11378,7	23674,5	12764,7	21917,7
06	2	19	8770,5	8554,5	2038,5	468	6174	14481	7240,5	9742,5
07	8	19	21033,9	19807,2	6572,7	1507,5	13923	39904,2	16146	23033,7
08	7	19	7524	6878,7	2050,2	470,7	5377,5	13768,2	6205,5	7954,2
09	7	19	11952,9	11614,5	3061,8	702,9	8833,5	22279,5	9857,7	13756,5
10	6	19	19098,9	17665,2	3221,1	738,9	15113,7	26179,2	16787,7	21483
11	8	19	30682,8	29313	14625,9	3355,2	13963,5	67552,2	16828,2	41022
12	7	19	27404,1	33853,5	13069,8	2997,9	7004,7	43400,7	13403,7	39469,5
13	2	19	13551,3	13570,2	7381,8	1693,8	5130	27967,5	6444	18979,2
14	4	19	7099,2	6286,5	2266,2	520,2	4696,2	13135,5	5492,7	8388
15	1	19	9171	9000	2240,1	513,9	5524,2	15752,7	7715,7	10271,7
16	8	19	383606	237465	276215	63368,1	169537,5	1053045	202725	462352,5
17	7	19	10001,7	9155,7	2732,4	626,4	6835,5	15514,2	7882,2	10933,2

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ10: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα βραδινά δείγματα κατσικίσιου γάλακτος τον Ιούνιο του 2019.

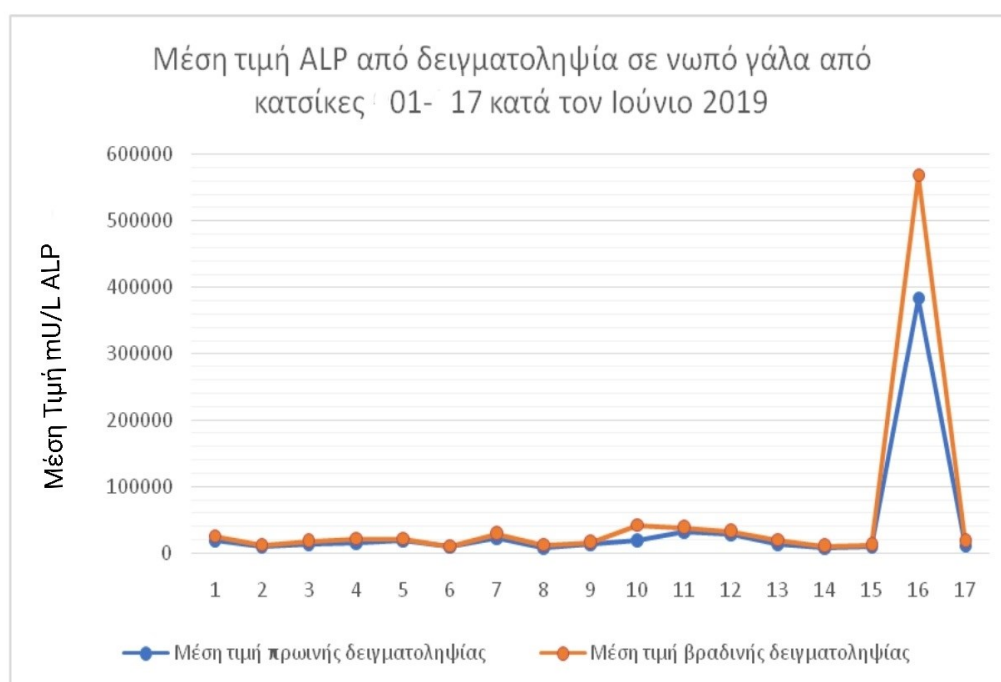
Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	10	24095,7	23312,7	8055	2547	13716	39944,7	17387,1	28931,4
02	4	10	11907	11977,2	2398,5	758,7	8989,2	17347,5	9616,5	12764,7
03	4	10	18226,8	16285,5	5800,5	1834,2	13849,2	33894	15177,6	19134
04	4	10	20350,8	20029,5	1461,6	462,6	18576	22351,5	18993,6	21931,2
05	3	10	20549,7	18344,7	5186,7	1639,8	15401,7	32229	17013,6	24344,1
06	2	10	10053	9365,4	2020,5	639	8597,7	15401,7	8959,5	10417,5
07	8	10	29134,8	24348,6	9423,9	2979,9	20086,2	48418,2	24020,1	34726,5
08	7	10	11855,7	9806,4	6117,3	1934,1	7126,2	28093,5	9081	11790,9
09	7	10	16017,3	15669,9	4441,5	1404,9	8440,2	25661,7	14272,2	17541,9
10	6	10	40749,3	22481,1	54450	17218,8	14956,2	195075	21922,2	29115,9
11	8	10	37992,6	35127	13041	4123,8	21960	67432,5	30258,9	42927,3
12	7	10	32605,2	33336	14703,3	4649,4	12494,7	51955,2	18574,2	47429,1
13	2	10	19016,1	14047,2	16380,9	5180,4	7479	63931,5	11061,9	20761,2
14	4	10	10502,1	10616,4	3037,5	960,3	7085,7	15793,2	7229,7	12564,9
15	1	10	12776,4	12355,2	3047,4	963,9	7922,7	20097	11567,7	13370,4
16	8	10	568453,5	364342,5	452434,5	143072,1	161032,5	1398712,5	214105	902367,9
17	7	10	18235,8	15039,9	10532,7	3330,9	11698,2	46978,2	12983,4	17314,2

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ11: Μέσος όρος τιμής ALP δειγματοληψίας πρωινών και βραδινών δειγμάτων Ιουνίου 2019.

Αριθμός Κατσίκας	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
01	18127,8	24095,7
02	9778,5	11907
03	12468,6	18226,8
04	14192,1	20350,8
05	17646,3	20549,7
06	8770,5	10053
07	21033,9	29134,8
08	7524	11855,7
09	11952,9	16017,3
10	19098,9	40749,3
11	30682,8	37992,6
12	27404,1	32605,2
13	13551,3	19016,1
14	7099,2	10502,1
15	9171	12776,4
16	383606,1	568453,5
17	10001,7	18235,8

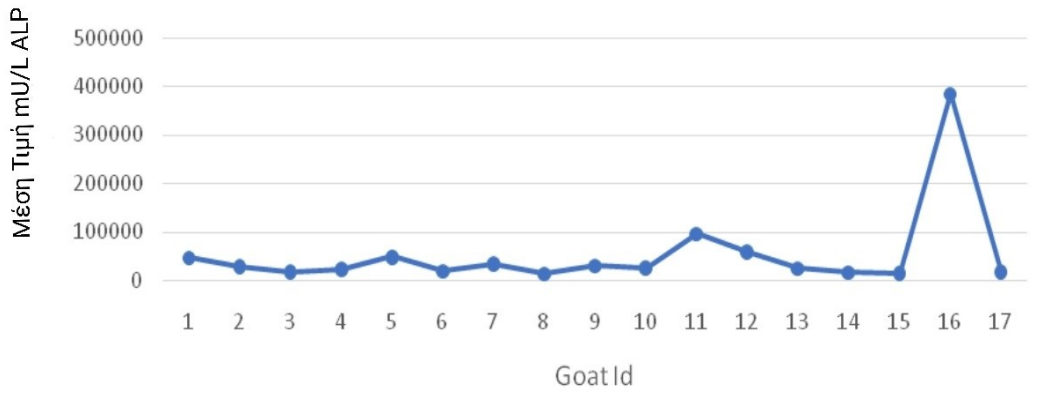


ΠΙΝΑΚΑΣ Δ12: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα πρωινά δείγματα κατσικίσου γάλακτος τον Ιούλιο του 2019.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	13	46474,2	41704,2	16227,9	4500,9	35095,5	98923,5	39604,5	46375,2
02	4	13	28061,1	17561,7	24128,1	6692,4	13417,2	87833,7	14709,6	28516,5
03	4	13	16742,7	11614,5	13660,2	3789	9342	49916,7	9990,9	13166,1
04	4	13	21986,1	16672,5	11671,2	3237,3	12152,7	54106,2	15489	27797,4
05	3	13	47620,8	28611	45202,5	12537	18463,5	151132,5	23376,6	45593,1
06	2	13	17739	15907,5	6641,1	1842,3	11036,7	30429	12737,7	22460,4
07	8	13	33426	27450	13956,3	3870,9	21451,5	65288,7	25682,4	36293,4
08	7	13	13223,7	10145,7	6445,8	1787,4	7686	28030,5	8714,7	16652,7
09	7	13	29962,8	14481	31203,9	8654,4	10818	98023,5	11641,5	42997,5
10	6	13	24726,6	22754,7	7033,5	1950,3	16942,5	36790,2	18261,9	30366,9
11	8	13	95419,8	95800,5	32904,9	9126	57663	168390	66378,6	115524
12	7	13	58510,8	44206,2	34772,4	9644,4	27576	135578,7	33672,6	67381,2
13	2	13	24295,5	18236,7	20315,7	5634,9	12247,2	89624,7	14439,6	24969,6
14	4	13	15921,9	13765,5	6570	1822,5	7591,5	29416,5	10240,2	20784,6
15	1	13	14050,8	12784,5	3605,4	999,9	10012,5	21771	11483,1	16554,6
16	8	13	383865,3	373702,5	154044,9	42723,9	105543	729202,5	312784,2	471645
17	7	13	16448,4	15824,7	5226,3	1449,9	10012,5	31246,2	13131	18193,5

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων
M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

Μέση τιμή ALP από δειγματοληψία σε νωπό
γάλα από κατσίκες 01- 17 κατά τον Ιούλιο
2019



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ13: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα πρωινά δείγματα κατσικίσου γάλακτος τον Αύγουστο του 2019.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	4	82683	80552,7	17575,2	8787,6	63607,5	106020	67311	100186,2
02	4	4	28093,5	27711	13779	6889,5	14049	42903	15280,2	41290,2
03	4	4	29353,5	13984,2	31860,9	15930	12348	77098,5	12400,2	61677
04	4	4	40100,4	21868,2	41418	20709	15120	101547	15209,1	83225,7
05	3	4	86636,7	38250	99610,2	49805,1	34074	235971	34321,5	187337,7
06	2	4	25036,2	21823,2	11118,6	5559,3	15412,5	41085	16974	36310,5
07	8	4	36806,4	34351,2	7476,3	3737,7	30883,5	47641,5	31437	44631,9
08	7	4	14443,2	13486,5	3157,2	1578,6	11853	18945	12076,2	17766
09	7	4	19636,2	18418,5	4129,2	2064,6	16155	25551	16537,5	23951,7
10	6	4	31635	28755	9763,2	4881,6	23476,5	45553,5	24263,1	41886,9
11	8	4	98973,9	99691,2	14121,9	7061,4	81108	115407	85252,5	111978,9
12	7	4	76001,4	78856,2	18905,4	9452,7	50391	95904	57155,4	91993,5
13	2	4	24154,2	24826,5	3552,3	1775,7	19530	27432	20466	27169,2
14	4	4	32400,9	29914,2	8385,3	4193,1	25258,5	44518,5	26271,9	41017,5
15	1	4	26644,5	26147,7	3145,5	1573,2	23503,5	30780	23900,4	29885,4
16	8	2	274810,5	274810,5	129767,4	91759,5	183051	366570	-	-
17	7	4	30589,2	30355,2	577,8	288,9	30204	31441,5	30218,4	31193,1

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ14: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα βραδινά δείγματα κατσικίσιου γάλακτος τον Αύγουστο του 2019.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	4	109264	111607,2	15619,5	7809,3	90256,5	123583,5	93396,6	122787
02	4	4	28394,1	28539	4674,6	2337,3	23130	33367,5	23843,7	32799,6
03	4	4	26887,5	19260	16254	8127	17829	51201	17882,1	43520,4
04	4	4	41657,4	28910,7	30124,8	15062,4	22446	86364	23097,6	72965,7
05	3	4	91404	59836,5	75545,1	37772,1	42201	203742	44957,7	169418,7
06	2	4	27543,6	27441	4555,8	2277,9	22752	32539,5	23255,1	31934,7
07	8	4	50475,6	48863,7	8761,5	4381,2	41931	62244	43011,9	59551,2
08	7	4	19776,6	19476	2697,3	1349,1	16816,5	23337	17400,6	22453,2
09	7	4	26618,4	27315	1648,8	824,4	24165	27679,5	24919,2	27621,9
10	6	4	37281,6	37060,2	5839,2	2919,6	31338	43668	31865,4	42919,2
11	8	4	130640	129933	6698,7	3348,9	123786	138910,5	124568	137421
12	7	4	98802,9	99801	11996,1	5998,5	84978	110632,5	86927,4	109681,2
13	2	4	37754,1	36990	8397,9	4199,4	29974,5	47061	30321,9	45949,5
14	4	4	50935,5	50569,2	17352	8676	30469,5	72135	34452	67786,2
15	1	4	37643,4	38725,2	4194	2097	31752	41373	33257,7	40949,1
16	8	2	247586	247585,5	103930,2	73489,5	174096	321075	-	-
17	7	4	45489,6	37876,5	17801,1	8900,1	34236	71968,5	34680,6	63911,7

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ15: Μέσος Όρος τιμής ALP δειγματοληψίας πρωινών και βραδινών δειγμάτων Αυγούστου 2019.

Αριθμός Κατσίκας	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
01	82683	109263,6
02	28093,5	28394,1
03	29353,5	26887,5
04	40100,4	41657,4
05	86636,7	91404
06	25036,2	27543,6
07	36806,4	50475,6
08	14443,2	19776,6
09	19636,2	26618,4
10	31635	37281,6
11	98973,9	130640,4
12	76001,4	98802,9
13	24154,2	37754,1
14	32400,9	50935,5
15	26644,5	37643,4
16	274810,5	247585,5
17	30589,2	45489,6



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ16: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα πρωινά δείγματα κατσικίσου γάλακτος τον Σεπτέμβριο του 2019.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	4	176499	151954,2	85955,4	42977,7	108481,5	293607	110302,2	267241,5
02	4	4	75505,5	72837	70220,7	35109,9	9765	146583	12537	141142,5
03	4	4	32542,2	20182,5	29385,9	14693,4	13572	76230	14503,5	62939,7
04	4	4	29852,1	26428,5	19618,2	9809,1	12141	54409,5	13124,7	50003,1
05	3	4	141068,7	132262,2	126888,3	63444,6	25281	274468,5	29015,1	261927,9
06	2	4	25082,1	24316,2	4748,4	2374,2	20479,5	31216,5	20950,2	29979,9
07	8	4	53676	47477,7	28772,1	14385,6	26167,5	93582	30155,4	83394,9
08	7	4	23785,2	20396,7	8922,6	4461,3	17586	36760,5	17756,1	33201,9
09	7	4	85522,5	26428,5	124028,1	62014,5	17977,5	271255,5	18272,7	211867,2
10	6	4	33502,5	31061,7	9743,4	4871,7	25033,5	46854	25695	43751,7
11	8	4	129508,2	124306,2	44200,8	22100,4	82971	186448,5	89773,2	174445,2
12	7	4	88213,5	82084,5	22063,5	11031,3	70996,5	117688,5	71145,9	111410,1
13	2	4	44766	42770,7	15130,8	7565,4	28962	64561,5	31336,2	60192
14	4	4	66429	62422,2	30381,3	15190,2	33781,5	107091	40199,4	96665,4
15	1	4	28323,9	28485	2595,6	1297,8	25029	31297,5	25774,2	30713,4
16	8	Θάνατος στις 20 Αυγούστου	-	-	-	-	-	-	-	-
17	7	4	50688	41789,7	18491,4	9245,7	40770	78403,5	40859,1	69416,1

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ17: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα βραδινά δείγματα κατσικίσου γάλακτος τον Σεπτέμβριο του 2019.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	4	209572,2	217404	97393,5	48696,3	96669	306810	113011,2	298300,5
02	4	4	129668,4	119290,5	121352,4	60676,2	21015	259079	23638,5	246077,1
03	4	4	48243,6	32096,7	39726,9	19863,9	22221	106560	22634,1	90000
04	4	4	47352,6	42316,2	29680,2	14840,1	22176	82602	22482	77259,6
05	3	4	209266,2	199721,7	179924,4	89962,2	44185,5	393435	49637,7	378439,2
06	2	4	35657,1	37917	8001	4000,5	24345	42448,5	27246,6	41807,7
07	8	4	79497,9	62494,2	36249,3	18124,2	59184	133821	60001,2	116000,1
08	7	4	35630,1	29488,5	17442	8721	22320	61222,5	23711,4	53689,5
09	7	4	138368,7	39834	204916,5	102458,7	28215	445590	30062,7	345208,5
10	6	4	42179,4	43150,5	19171,8	9585,9	17977,5	64440	23490	59898,6
11	8	4	182241,9	190719	64269,9	32134,5	97947	249584	116783,1	239224,5
12	7	4	130831,2	110288,7	49996,8	24998,4	97497	205250	100268,1	181935,9
13	2	4	77186,7	72135	37162,8	18581,4	39469,5	125006	44176,5	115247,7
14	4	4	115069,5	89374,5	60409,8	30204,9	77247	204282	77551,2	178283,7
15	1	4	50454	47972,7	12569,4	6284,7	39676,5	66195	40003,2	63387
16	8	Θάνατος περίπου στις 20 Αυγούστου	-	-	-	-	-	-	-	-
17	7	4	97729,2	80977,5	47126,7	23563,8	63940,5	165020	64525,5	147683,7

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ18: Μέσος όρος τιμής ALP δειγματοληψίας πρωινών και βραδινών δειγμάτων Σεπτεμβρίου 2019.

Αριθμός Κατσίκας	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
01	176499	209572,2
02	75505,5	129668,4
03	32542,2	48243,6
04	29852,1	47352,6
05	141068,7	209266,2
06	25082,1	35657,1
07	53676	79497,9
08	23785,2	35630,1
09	85522,5	138368,7
10	33502,5	42179,4
11	129508,2	182241,9
12	88213,5	130831,2
13	44766	77186,7
14	66429	115069,5
15	28323,9	50454
16	-	-
17	50688	97729,2



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ19: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα πρωινά δείγματα κατσικίσου γάλακτος τον Οκτώβριο του 2019.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	5	286047	182664	325355,4	145503,9	84753	862650	98793	524992,5
02	4	5	36250,2	25402,5	24535,8	10972,8	18949,5	77139	18961,2	58963,5
03	4	5	19685,7	16753,5	7341,3	3283,2	14697	32454	15023,7	25814,7
04	4	5	61604,1	15268,5	100886,4	45117,9	12537	241888,5	13288,5	133087,5
05	3	5	81162	87237	46487,7	20790	35662,5	149787	37876,5	121410
06	2	5	30485,7	26334	10707,3	4788,9	23872,5	49396,5	24219	38828,7
07	8	5	66349,8	74493	18567,9	8303,4	37174,5	81526,5	48053,7	80575,2
08	7	5	25934,4	24102	8717,4	3898,8	18679,5	39996	18886,5	33898,5
09	7	5	38311,2	25033,5	22311,9	9978,3	19732,5	70893	21699	61562,7
10	6	5	45860,4	37174,5	23909,4	10692,9	29457	87804	31185	64879,2
11	8	5	245794,5	167602,5	174782,7	78165	91102,5	536233,5	126353,7	404332,2
12	7	5	83763,9	91246,5	22890,6	10236,6	53374,5	106123,5	59929,2	103858,2
13	2	5	59861,7	59994	10807,2	4833	47871	76437	50521,5	69136,2
14	4	5	77959,8	84361,5	15908,4	7114,5	49711,5	87480	66001,5	86717,7
15	1	5	45715,5	42777	10332	4620,6	34749	62244	37937,7	54963
16	8	Θάνατος περίπου στις 20 Αυγούστου	-	-	-	-	-	-	-	-
17	7	5	85458,6	51511,5	69559,2	31107,6	27553,5	201105	38353,5	149537,7

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ20: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα βραδινά δείγματα κατσίκιου γάλακτος τον Οκτώβριο του 2019.

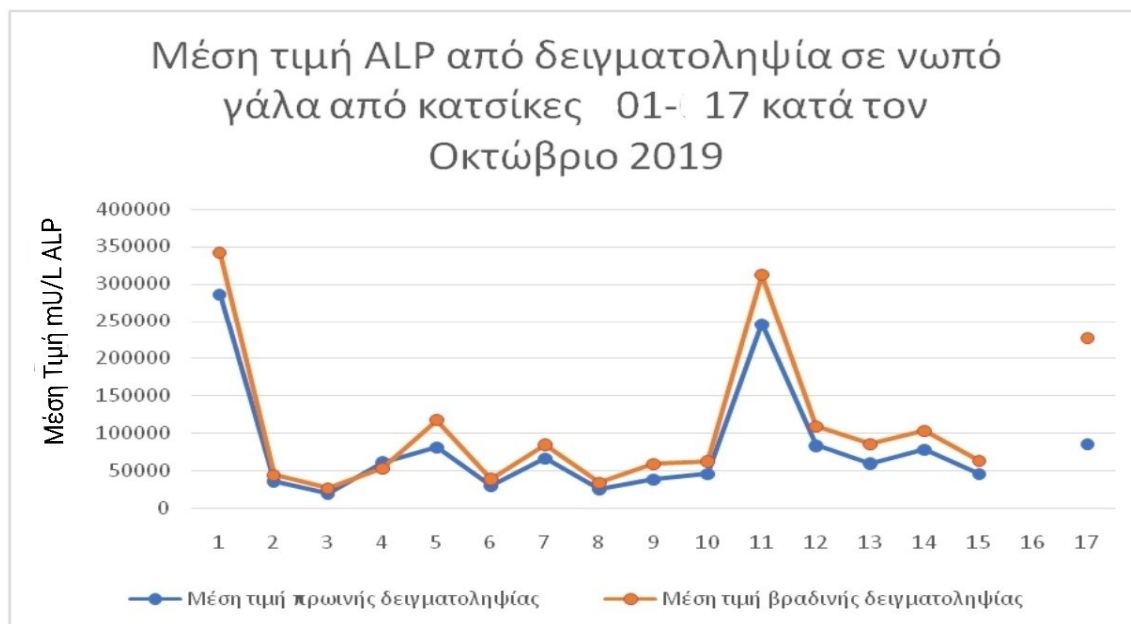
Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	5	341154,9	247576,5	334796,4	149726	109161	929655	134732,7	594367,2
02	4	5	44286,3	30987	39302,1	17576	19863	113548,5	20473,2	74749,5
03	4	5	27257,4	24183	6325,2	2828,7	21910,5	34960,5	21971,7	34081,2
04	4	5	53338,5	21784,5	65921,4	29480	16920	170293,5	18110,7	104344,2
05	3	5	117780,3	120375	76417,2	34175	42759	228649,5	46440	187823,7
06	2	5	39573	32580	16978,5	7592,4	29457	69547,5	29695,5	52947
07	8	5	84943,8	76414,5	29446,2	13169	52236	128259	60592,5	113560,2
08	7	5	34002,9	34110	9049,5	4047,3	21411	46422	26363,7	41589
09	7	5	59005,8	48550,5	21010,5	9396	44374,5	94725	45324	77915,7
10	6	5	62808,3	47331	39235,5	17546	30762	125545,5	32737,5	100618,2
11	8	5	312161,4	293760	197160,3	88173	96210	567045	125451	508072,5
12	7	5	109142,1	92241	53530,2	23940	72774	203683,5	77812,2	148923
13	2	5	85500,9	91476	22773,6	10184	54553,5	114687	63724,5	104290,2
14	4	5	103456,8	105813	23590,8	10550	64354,5	127075,5	84751,2	120985,2
15	1	5	63998,1	62181	18230,4	8153,1	43564,5	86553	46636,2	82269
16	8	Θάνατος περίπου στις 20 Αυγούστου	-	-	-	-	-	-	-	-
17	7	5	226642,5	75028,5	332284,5	148602	50454	819585	61708,5	467383,5

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ21: Μέσος Όρος τιμής ALP δειγματοληψίας πρωινών και βραδινών δειγμάτων Οκτωβρίου 2019.

Αριθμός Κατσίκας	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
01	286047	341154,9
02	36250,2	44286,3
03	19685,7	27257,4
04	61604,1	53338,5
05	81162	117780,3
06	30485,7	39573
07	66349,8	84943,8
08	25934,4	34002,9
09	38311,2	59005,8
10	45860,4	62808,3
11	245795	312161,4
12	83763,9	109142,1
13	59861,7	85500,9
14	77959,8	103456,8
15	45715,5	63998,1
16	-	-
17	85458,6	226642,5



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ22: ΠΙΝΑΚΑΣ Δ20: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα πρωινά δείγματα κατσικίσιου γάλακτος τον Νοέμβριο του 2019.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	4	703800	596385	292812,3	146406,6	486360	1136070	513506,7	1001509,2
02	4	4	16792,2	17739	5559,3	2780,1	9369	22320	11055,6	21581,1
03	4	4	23299,2	18628,2	12497,4	6248,7	14211	41728,5	15028,2	36241,2
04	4	4	17836,2	17397	3887,1	1943,1	14085	22464	14369,4	21740,4
05	3	4	93400,2	98449,2	36241,2	18120,6	45468	131233,5	56474,1	125276,4
06	2	4	39553,2	39211,2	5968,8	2984,4	32872,5	46917	33964,2	45484,2
07	8	4	105298,2	112876,2	23472	11736	72297	123142,5	80423,1	122594,4
08	7	4	32461,2	28960,2	12465,9	6233,4	22234,5	49689	22793,4	45629,1
09	7	4	43240,5	48418,2	16128,9	8064,9	20871	55255,5	26156,7	55147,5
10	6	4	21405,6	20459,7	3721,5	1860,3	17995,5	26707,5	18590,4	25166,7
11	8	4	199872	199768,5	90368,1	45183,6	91746	308205	112964,4	286883,1
12	7	4	145111,5	140089,5	52587	26293,5	86121	214146	99571,5	195673,5
13	2	4	57055,5	54571,5	14764,5	7381,8	41877	77202	44642,7	71953,2
14	4	4	66140,1	65761,2	13097,7	6548,4	53662,5	79375,5	54292,5	78366,6
15	1	4	34797,6	30609	9031,5	4515,3	29646	48325,5	29843,1	43940,7
16	8	Θάνατος περίπου στις 20 Αυγούστου	-	-	-	-	-	-	-	-
17	7	4	94777,2	76592,7	56538	28269	48906	177016,5	54449,1	153288,9

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ23: ΠΙΝΑΚΑΣ Δ20: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα βραδινά δείγματα κατσικίσου γάλακτος τον Νοέμβριο του 2019.

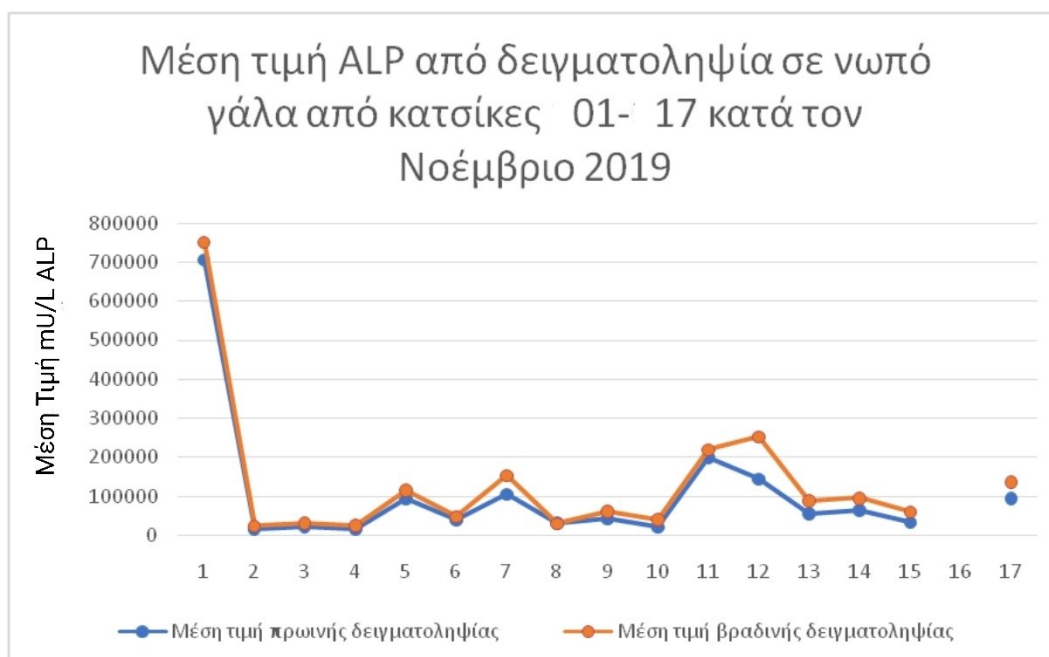
Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	4	751275	679860	157822,2	78911,1	658440	986940	660409,2	913556,7
02	4	4	24602,4	23697	11985,3	5992,2	11898	39118,5	13511,7	36599,4
03	4	4	30935,7	32692,5	7760,7	3880,8	20047,5	38308,5	22984,2	37129,5
04	4	4	25578	27605,7	5305,5	2653,2	17788,5	29313	20018,7	29110,5
05	3	4	115932,6	111127,5	55976,4	27988,2	52524	188950,5	66958,2	169712,1
06	2	4	47957,4	50125,5	13271,4	6635,7	31360,5	60219	34344,9	59402,7
07	8	2	154154,7	154154,7	62898,3	44476,2	109678,5	198630	-	-
08	7	4	30072,6	30935,7	7248,6	3624,3	20439	37980	22905	36377,1
09	7	4	61216,2	65284,2	17964	8982	36162	78133,5	42631,2	75733,2
10	6	4	40715,1	40574,7	13886,1	6943,5	24885	56826	27346,5	54224,1
11	8	2	219445,2	219445,2	128198,7	90650,7	128794,5	310095	-	-
12	7	2	252621	252621	193285,8	136674	115947	389295	-	-
13	2	4	88083	97400,7	25331,4	12665,7	50971,5	106560	61568,1	105281,1
14	4	4	95184	100928,7	21681,9	10840,5	64710	114169,5	72450,9	112172,4
15	1	4	59925,6	52918,2	22981,5	11490,3	40981,5	92884,5	42833,7	84024,9
16	8	Θάνατος περίπου στις 20 Αυγούστου	-	-	-	-	-	-	-	-
17	7	4	136665	99502,2	90459,9	45230,4	76995	270661,5	79709,4	230783,4

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ24: Μέσος όρος τιμής ALP δειγματοληψίας πρωινών και βραδινών δειγμάτων Νοεμβρίου 2019.

Αριθμός Κατσίκας	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
01	703800	751275
02	16792,2	24602,4
03	23299,2	30935,7
04	17836,2	25578
05	93400,2	115932,6
06	39553,2	47957,4
07	105298,2	154154,7
08	32461,2	30072,6
09	43240,5	61216,2
10	21405,6	40715,1
11	199872	219445,2
12	145111,5	252621
13	57055,5	88083
14	66140,1	95184
15	34797,6	59925,6
16	-	-
17	94777,2	136665



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ25: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα πρωινά δείγματα κατσικίσιου γάλακτος τον Δεκέμβριο του 2019.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	3	493724,7	477450	71314,2	41173,2	431955	571770	431955	571770
02	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	4	3	23753,7	20934	7047	4068,9	18553,5	31774,5	18553,5	31774,5
04	4	3	14542,2	13072,5	3460,5	1998	12060	18495	12060	18495
05	3	3	84609	64791	58728,6	33906,6	38353,5	150682,5	38353,5	150682,5
06	2	3	41559,3	33390	19327,5	11159,1	27657	63630	27657	63630
07	8	2	260773,2	260773,2	110672,1	78257,7	182515,5	339030	-	-
08	7	3	23105,7	20583	5670,9	3274,2	19134	29601	19134	29601
09	7	3	64861,2	67896	13539,6	7816,5	50062,5	76626	50062,5	76626
10	6	3	31654,8	29889	12341,7	7125,3	20290,5	44784	20290,5	44784
11	8	2	291042	291042	171470,7	121248	169794	412290	-	-
12	7	Θάνατος	-	-	-	-	-	-	-	-
13	2	3	61272	68616	16416	9477,9	42466,5	72733,5	42466,5	72733,5
14	4	3	60094,8	70272	24767,1	14299,2	31860	78151,5	31860	78151,5
15	1	3	54447,3	47970	17974,8	10377,9	40608	74763	40608	74763
16	8	Θάνατος περίπου στις 20 Αυγούστου	-	-	-	-	-	-	-	-
17	7	3	151516,8	89343	146016,9	84303	46876,5	318330	46876,5	318330

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

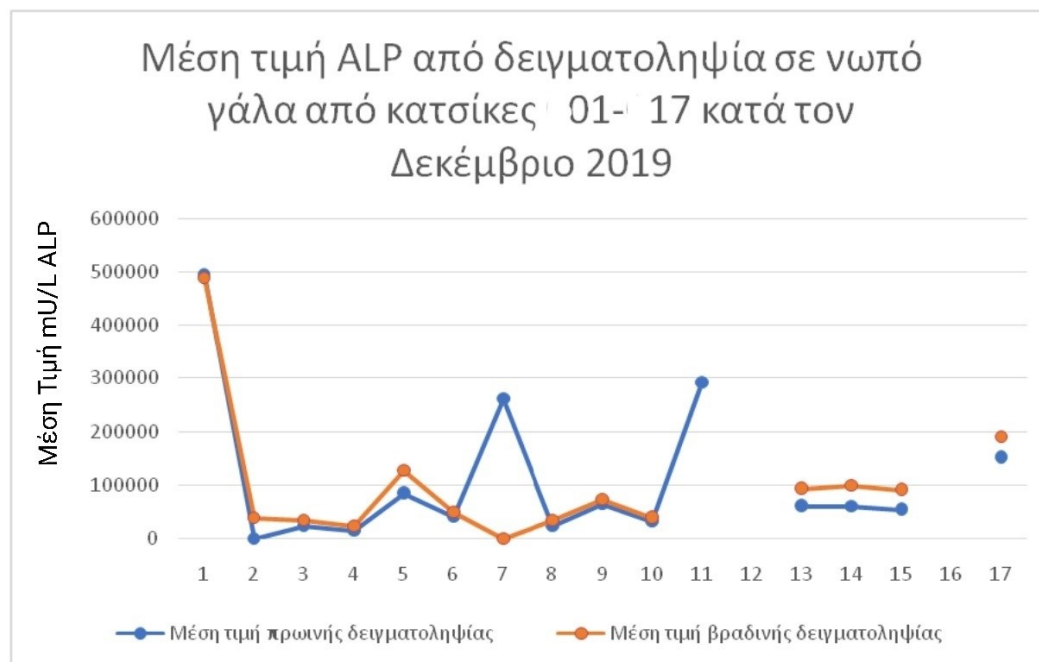
ΠΙΝΑΚΑΣ Δ26: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα βραδινά δείγματα κατσικίσιου γάλακτος τον Δεκέμβριο του 2019.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	3	488565	457830	88881,3	51316,2	419130	588735	419130	588735
02	4	3	38344,5	19570,5	35624,7	20567,7	16033,5	79429,5	16033,5	79429,5
03	4	3	34767	26374,5	18636,3	10759,5	21802,5	56124	21802,5	56124
04	4	3	24009,3	24430,5	6761,7	3904,2	17046	30550,5	17046	30550,5
05	3	3	127861,2	67086	125997,3	72745,2	43771,5	272727	43771,5	272727
06	2	3	49088,7	56556	15563,7	8985,6	31198,5	59512,5	31198,5	59512,5
07	8	Θάνατος	-	-	-	-	-	-	-	-
08	7	3	33869,7	21888	21513,6	12420,9	21015	58707	21015	58707
09	7	3	72902,7	82557	26469,9	15282	42961,5	93190,5	42961,5	93190,5
10	6	3	39505,5	48613,5	17748	10246,5	19053	50850	19053	50850
11	8	Θάνατος	-	-	-	-	-	-	-	-
12	7	Θάνατος	-	-	-	-	-	-	-	-
13	2	3	93591	68989,5	44506,8	25695,9	66816	144967,5	66816	144967,5
14	4	3	99529,2	64354,5	85608,9	49426,2	37111,5	197122,5	37111,5	197122,5
15	1	3	91855,8	69196,5	52461,9	30289,5	54531	151839	54531	151839
16	8	Θάνατος περίπου στις 20 Αυγούστου	-	-	-	-	-	-	-	-
17	7	3	190271,7	95553	174606,3	100809	83493	391770	83493	391770

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων
M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ27: Μέσος Όρος τιμής ALP δειγματοληψίας πρωινών και βραδινών δειγμάτων Δεκεμβρίου 2019.

Αριθμός Κατσίκας	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
01	493724,7	488565
02	-	38344,5
03	23753,7	34767
04	14542,2	24009,3
05	84609	127861,2
06	41559,3	49088,7
07	260773,2	-
08	23105,7	33869,7
09	64861,2	72902,7
10	31654,8	39505,5
11	291042	-
12	-	-
13	61272	93591
14	60094,8	99529,2
15	54447,3	91855,8
16	-	-
17	151516,8	190271,7



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ28: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα πρωινά δείγματα κατσικίσου γάλακτος τον Ιανουάριο του 2020.

Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	2	210940	210940,2	21914,1	15495,3	195444	226435,5	-	-
02	4	3	28701	17235	20636,1	11914,2	16344	52524	16344	52524
03	4	3	34463,7	30595,5	14892,3	8597,7	21888	50908,5	21888	50908,5
04	4	3	36835,2	25965	22984,2	13269,6	21303	63238,5	21303	63238,5
05	3	3	99405	65119,5	62325,9	35983,8	61749	171346,5	61749	171346,5
06	2	3	24306,3	21636	5171,4	2986,2	21015	30267	21015	30267
07	8	Θάνατος	-	-	-	-	-	-	-	-
08	7	3	23293,8	20232	5447,7	3145,5	20065,5	29583	20065,5	29583
09	7	1	172404	172404	-	-	172404	172404	-	-
10	6	3	61777,8	52812	24750,9	14290,2	42759	89761,5	42759	89761,5
11	8	Θάνατος	-	-	-	-	-	-	-	-
12	7	Θάνατος	-	-	-	-	-	-	-	-
13	2	3	56301,3	61767	12868,2	7429,5	41602,5	65533,5	41602,5	65533,5
14	4	3	69921	60111	22458,6	12966,3	54036	95616	54036	95616
15	1	3	67590	49131	33543	19366,2	47331	106308	47331	106308
16	8	Θάνατος περίπου στις 20 Αυγούστου	-	-	-	-	-	-	-	-
17	7	3	91131,3	56992,5	61984,8	35786,7	53721	162679,5	53721	162679,5

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ29: Μεταβλητότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε μεμονωμένα βραδινά δείγματα κατσικίσου γάλακτος τον Ιανουάριο του 2020.

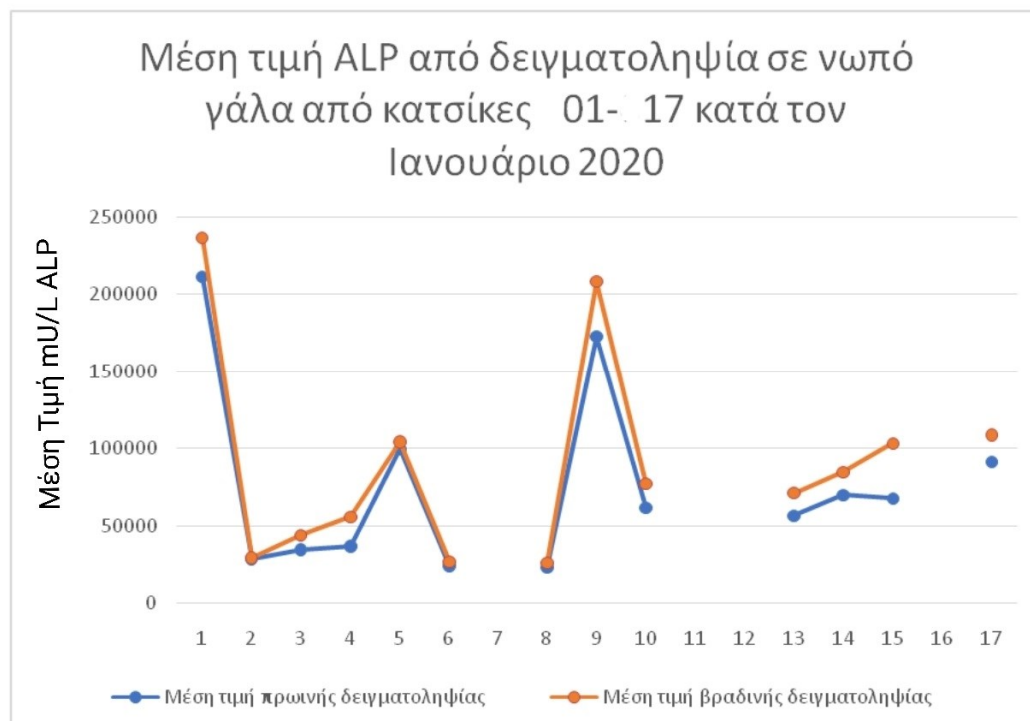
Κωδικός κατσίκας	Ηλικία	Αριθμ. δειγμάτων	Μέση τιμή	Ενδιάμεση τιμή	s.d. (±)	Μέσο τυπικό σφάλμα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	M1	M2
01	4	2	235901,7	235901,7	37900,8	26799,3	209101,5	262701	-	-
02	4	3	29167,2	22630,5	12357,9	7134,3	21451,5	43420,5	21451,5	43420,5
03	4	3	43814,7	38169	19596,6	11313,9	27661,5	65614,5	27661,5	65614,5
04	4	3	55568,7	38164,5	30414,6	17559,9	37854	90688,5	37854	90688,5
05	3	3	103959	85851	31703,4	18304,2	85459,5	140566,5	85459,5	140566,5
06	2	3	26650,8	26437,5	3159,9	1824,3	23602,5	29911,5	23602,5	29911,5
07	8	Θάνατος	-	-	-	-	-	-	-	-
08	7	3	26107,2	26707,5	2890,8	1669,5	22963,5	28651,5	22963,5	28651,5
09	7	1	208021,5	208021,5	-	-	208021,5	208021,5	-	-
10	6	3	77181,3	63486	31968	18456,3	54342	113715	54342	113715
11	8	Θάνατος	-	-	-	-	-	-	-	-
12	7	Θάνατος	-	-	-	-	-	-	-	-
13	2	3	70885,8	67045,5	10384,2	5994,9	62968,5	82642,5	62968,5	82642,5
14	4	3	84476,7	83281,5	6791,4	3921,3	78363	91786,5	78363	91786,5
15	1	3	102970,8	88272	40391,1	23319,9	71986,5	148653	71986,5	148653
16	8	Θάνατος	-	-	-	-	-	-	-	-
17	7	3	108451,8	76702,5	68087,7	39310,2	62037	186615	62037	186615

M1= Μέση τιμή του πρώτου μισού του συνόλου των δειγμάτων

M2= Μέση τιμή του δεύτερου μισού του συνόλου δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ30: Μέσος Όρος τιμής ALP δειγματοληψίας πρωινών και βραδινών δειγμάτων Ιανουαρίου 2020.

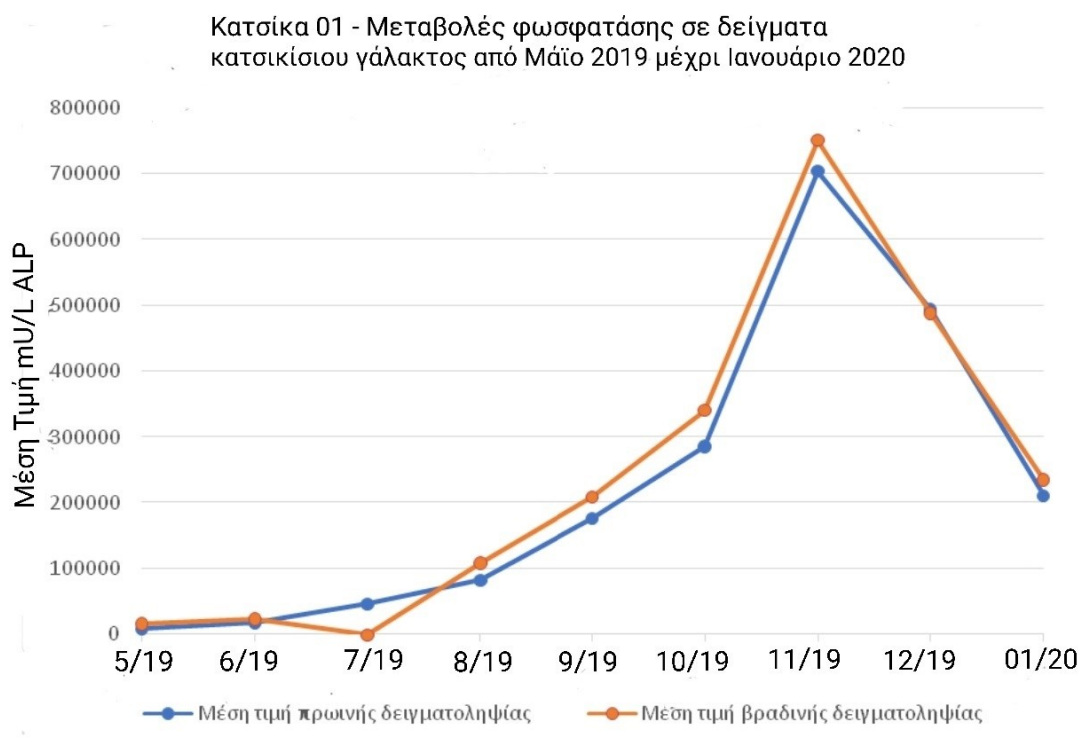
Αριθμός Κατσίκας	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
01	210940,2	235901,7
02	28701	29167,2
03	34463,7	43814,7
04	36835,2	55568,7
05	99405	103959
06	24306,3	26650,8
07	-	-
08	23293,8	26107,2
09	172404	208021,5
10	61777,8	77181,3
11	-	-
12	-	-
13	56301,3	70885,8
14	69921	84476,7
15	67590	102970,8
16	-	-
17	91131,3	108451,8



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ31

Κατσίκια 01 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

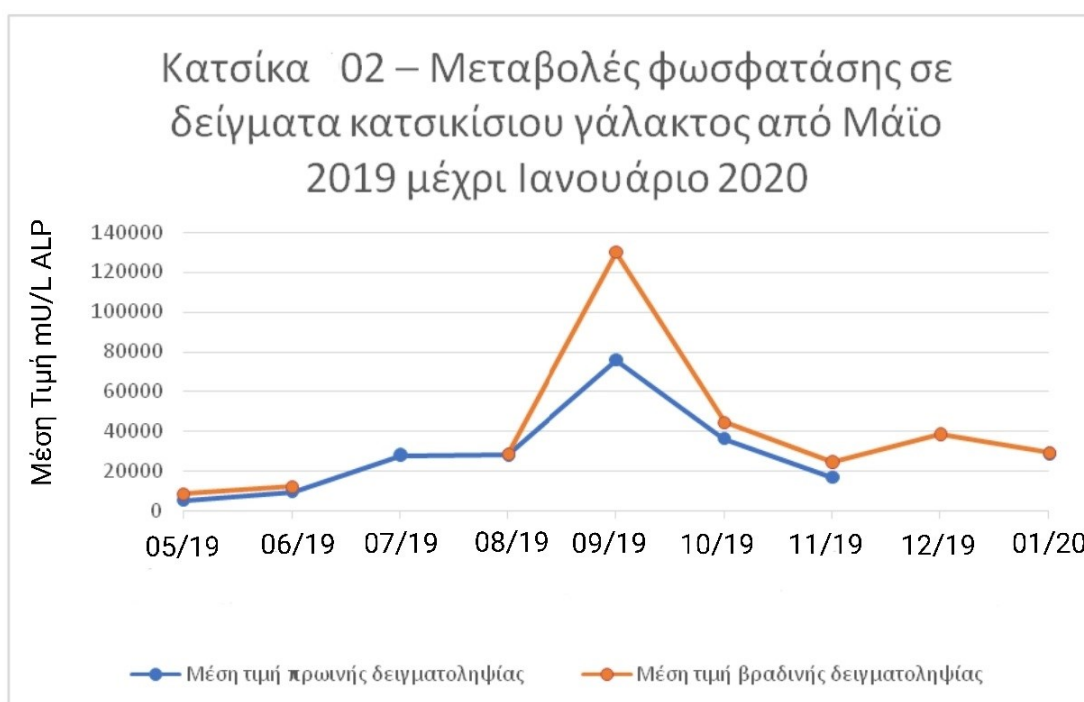
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	8760,6	16665,3
6 ^{ος} 2019	17707,5	24095,7
7 ^{ος} 2019	46474,2	-
8 ^{ος} 2019	82683	109263,6
9 ^{ος} 2019	176499	209572,2
10 ^{ος} 2019	286047	341154,9
11 ^{ος} 2019	703800	751275
12 ^{ος} 2019	493724,7	488565
1 ^{ος} 2020	210940,2	235901,7



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ32

Κατσικά 02 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

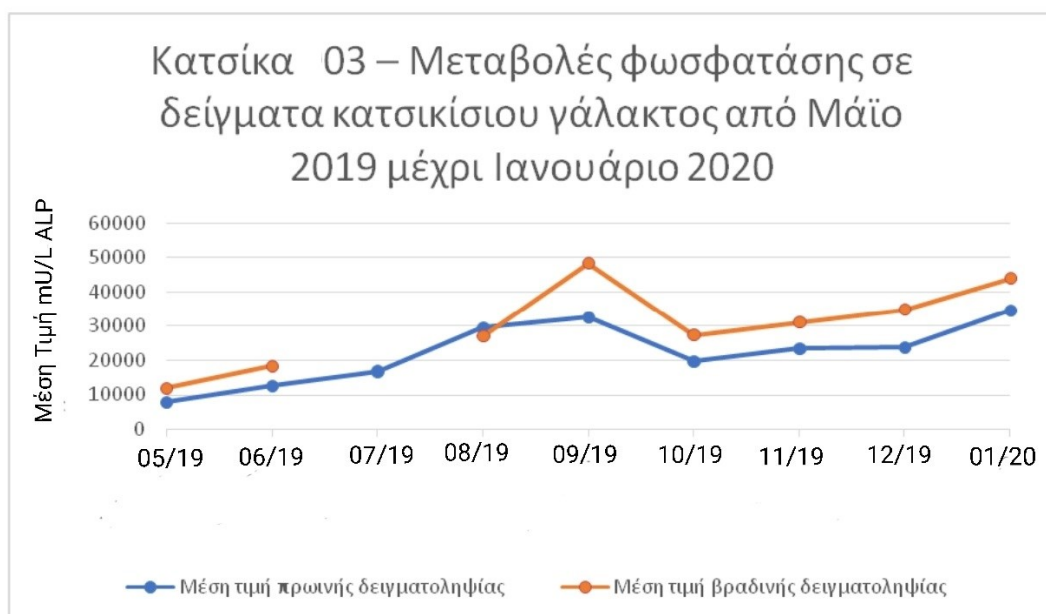
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	5442,3	8527,5
6 ^{ος} 2019	9778,5	11907
7 ^{ος} 2019	28061,1	-
8 ^{ος} 2019	28093,5	28394,1
9 ^{ος} 2019	75505,5	129668,4
10 ^{ος} 2019	36250,2	44286,3
11 ^{ος} 2019	16792,2	24602,4
12 ^{ος} 2019	-	38344,5
1 ^{ος} 2020	28701	29167,2



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ33

Κατσίκια 03 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

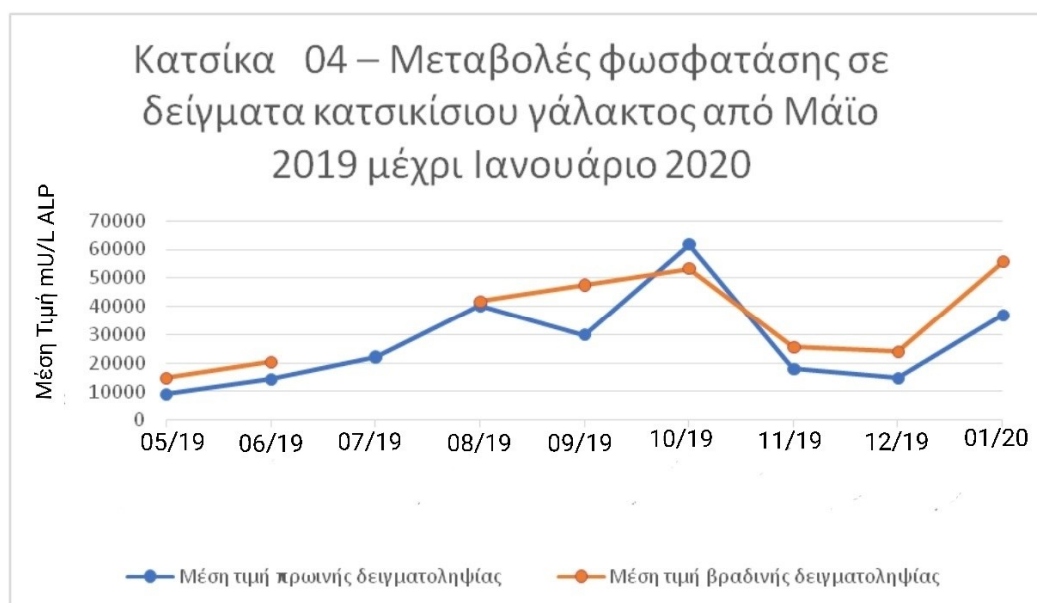
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	7899,3	11780,1
6 ^{ος} 2019	12468,6	18226,8
7 ^{ος} 2019	16742,7	-
8 ^{ος} 2019	29353,5	26887,5
9 ^{ος} 2019	32542,2	48243,6
10 ^{ος} 2019	19685,7	27257,4
11 ^{ος} 2019	23299,2	30935,7
12 ^{ος} 2019	23753,7	34767
1 ^{ος} 2020	34463,7	43814,7



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ34

Κατσίκια 04 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

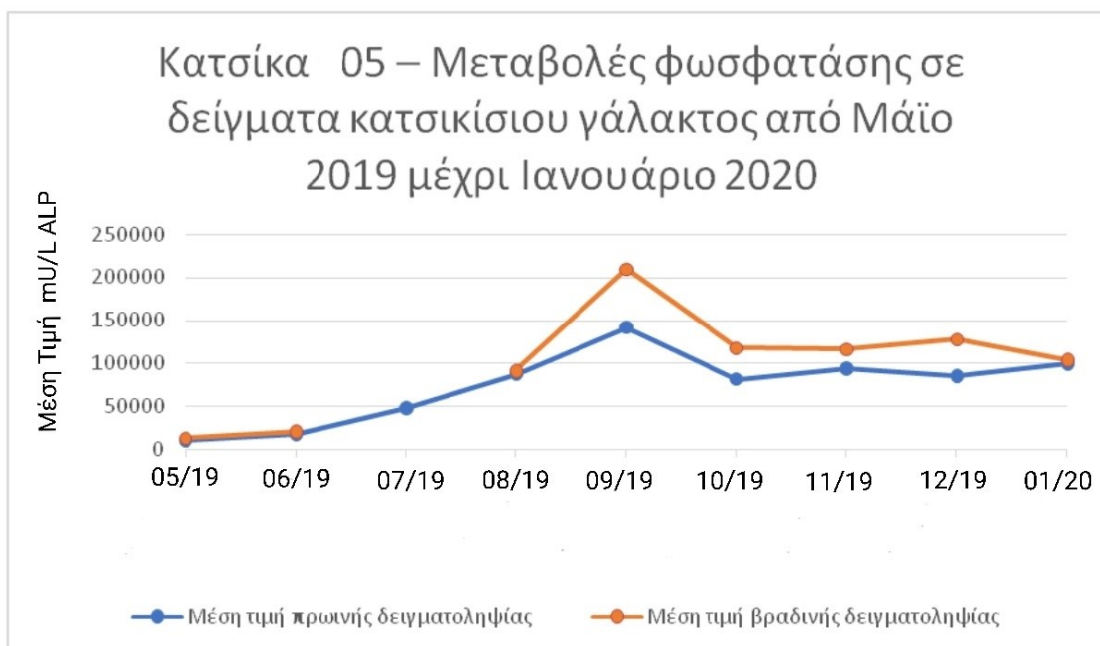
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	9060,3	14759,1
6 ^{ος} 2019	14192,1	20350,8
7 ^{ος} 2019	21986,1	-
8 ^{ος} 2019	40100,4	41657,4
9 ^{ος} 2019	29852,1	47352,6
10 ^{ος} 2019	61604,1	53338,5
11 ^{ος} 2019	17836,2	25578
12 ^{ος} 2019	14542,2	24009,3
1 ^{ος} 2020	36835,2	55568,7



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ35

Κατσικά 05 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

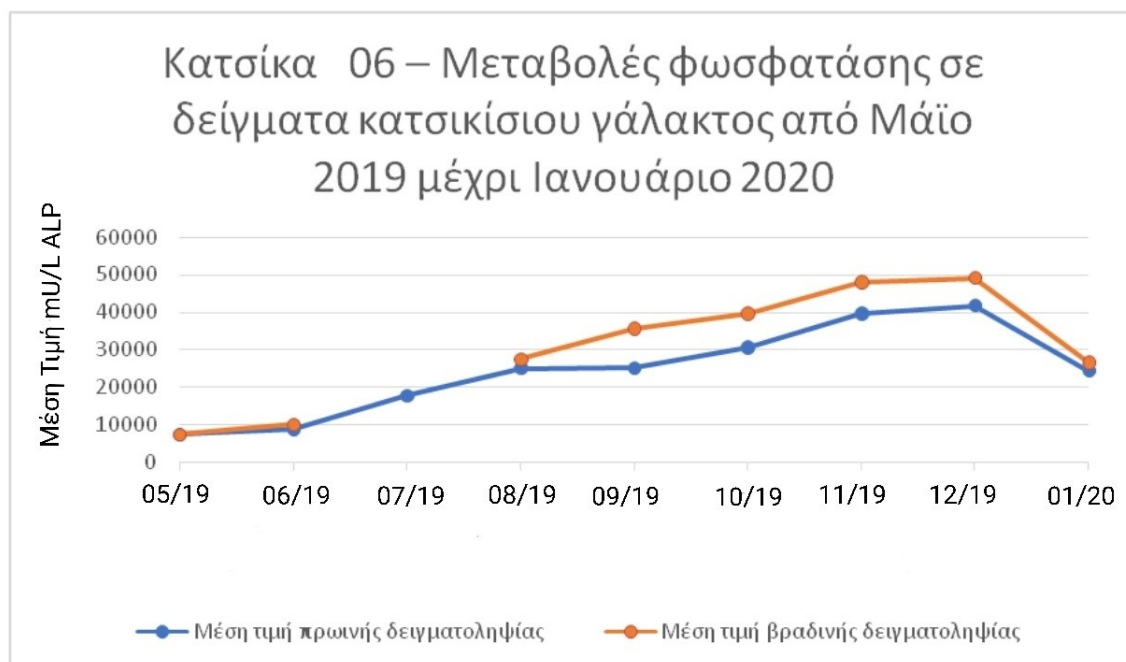
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	9940,5	13155,3
6 ^{ος} 2019	17646,3	20549,7
7 ^{ος} 2019	47620,8	-
8 ^{ος} 2019	86636,7	91404
9 ^{ος} 2019	141068,7	209266,2
10 ^{ος} 2019	81162	117780,3
11 ^{ος} 2019	93400,2	115932,6
12 ^{ος} 2019	84609	127861,2
1 ^{ος} 2020	99405	103959



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ36

Κατσίκια 06 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

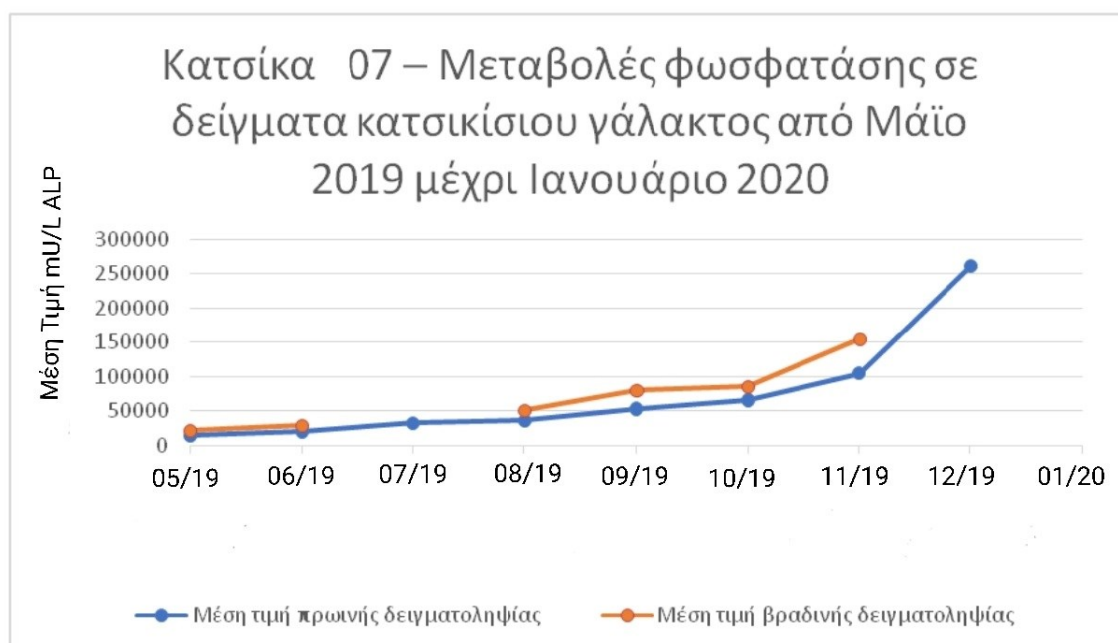
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	7522,2	7490,7
6 ^{ος} 2019	8770,5	10053
7 ^{ος} 2019	17739	-
8 ^{ος} 2019	25036,2	27543,6
9 ^{ος} 2019	25082,1	35657,1
10 ^{ος} 2019	30485,7	39573
11 ^{ος} 2019	39553,2	47957,4
12 ^{ος} 2019	41559,3	49088,7
1 ^{ος} 2020	24306,3	26650,8



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ37

Κατσίκια 07 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

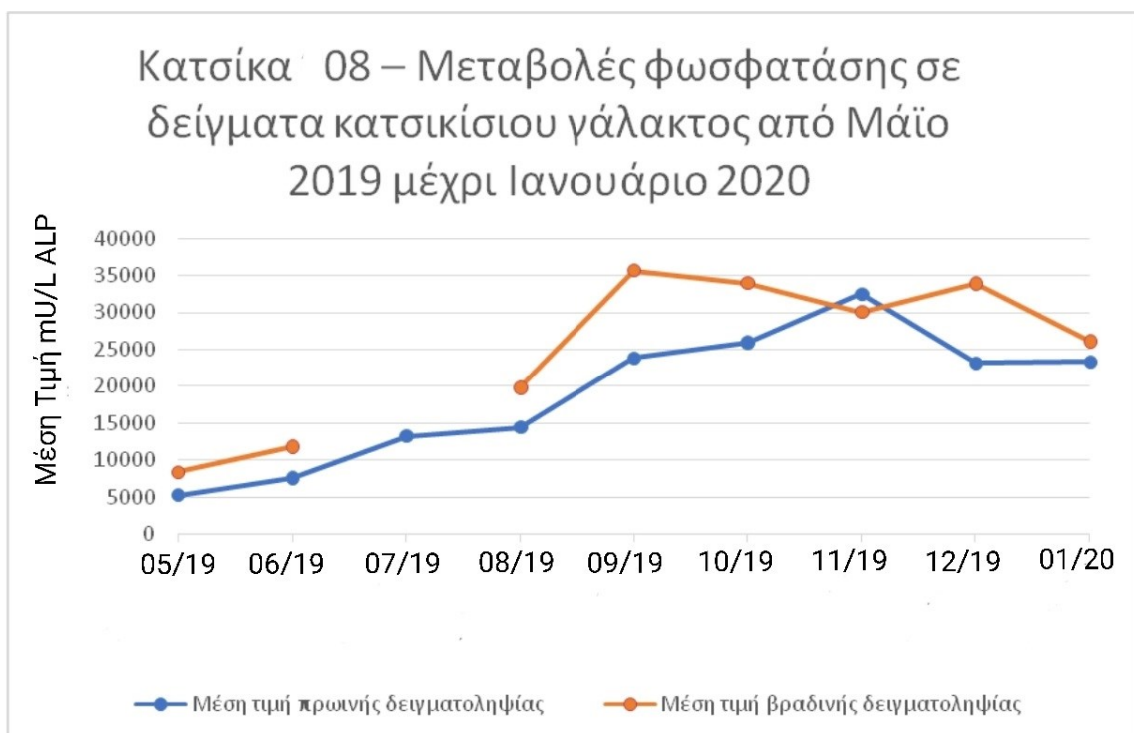
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	15290,1	22028,4
6 ^{ος} 2019	21033,9	29134,8
7 ^{ος} 2019	33426	-
8 ^{ος} 2019	36806,4	50475,6
9 ^{ος} 2019	53676	79497,9
10 ^{ος} 2019	66349,8	84943,8
11 ^{ος} 2019	105298,2	154154,7
12 ^{ος} 2019	260773,2	-
1 ^{ος} 2020	-	-



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ38

Κατσικά 08 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

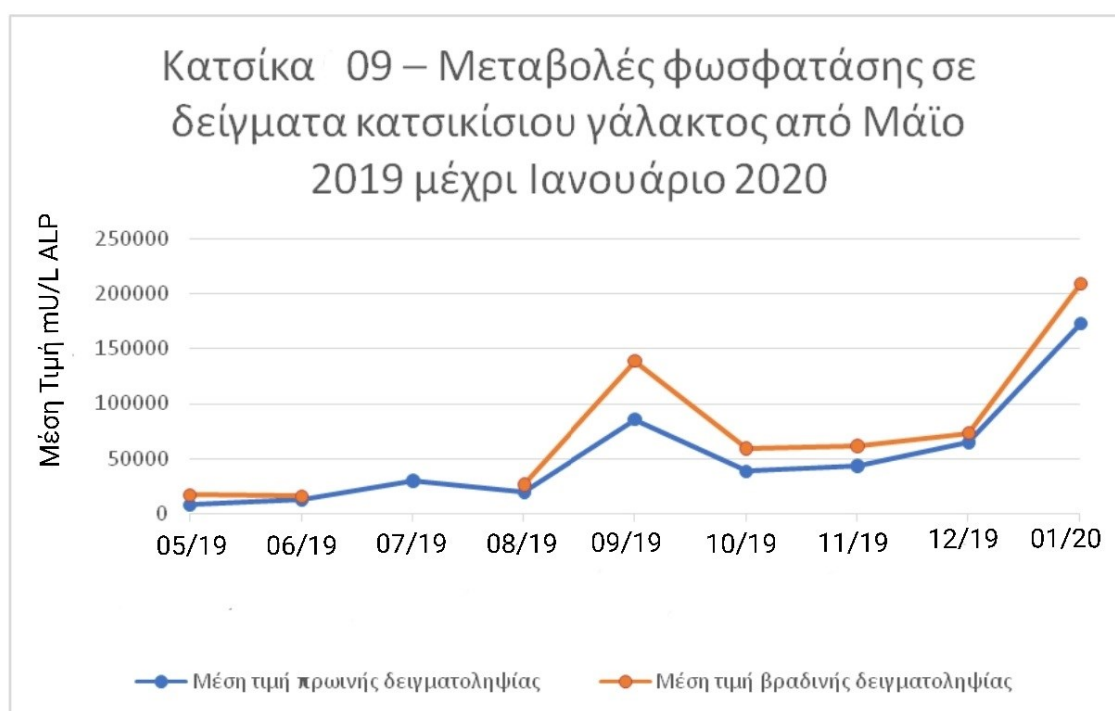
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	5241,51	8384,4
6 ^{ος} 2019	7524	11855,7
7 ^{ος} 2019	13223,7	-
8 ^{ος} 2019	14443,2	19776,6
9 ^{ος} 2019	23785,2	35630,1
10 ^{ος} 2019	25934,4	34002,9
11 ^{ος} 2019	32461,2	30072,6
12 ^{ος} 2019	23105,7	33869,7
1 ^{ος} 2020	23293,8	26107,2



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ39

Κατσίκια 09 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	7981,2	16932,6
6 ^{ος} 2019	11952,9	16017,3
7 ^{ος} 2019	29962,8	-
8 ^{ος} 2019	19636,2	26618,4
9 ^{ος} 2019	85522,5	138368,7
10 ^{ος} 2019	38311,2	59005,8
11 ^{ος} 2019	43240,5	61216,2
12 ^{ος} 2019	64861,2	72902,7
1 ^{ος} 2020	172404	208021,5



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ40

Κατσικά 10 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	-	18459
6 ^{ος} 2019	19098,9	40749,3
7 ^{ος} 2019	24726,6	-
8 ^{ος} 2019	31635	37281,6
9 ^{ος} 2019	33502,5	42179,4
10 ^{ος} 2019	45860,4	62808,3
11 ^{ος} 2019	21405,6	40715,1
12 ^{ος} 2019	31654,8	39505,5
1 ^{ος} 2020	61777,8	77181,3



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ41

Κατσικά 11 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	18134,1	29232,9
6 ^{ος} 2019	30682,8	37992,6
7 ^{ος} 2019	95419,8	-
8 ^{ος} 2019	98973,9	130640,4
9 ^{ος} 2019	129508,2	182241,9
10 ^{ος} 2019	245794,5	312161,4
11 ^{ος} 2019	199872	219445,2
12 ^{ος} 2019	291042	-
1 ^{ος} 2020	-	-



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ42

Κατσικά 12 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

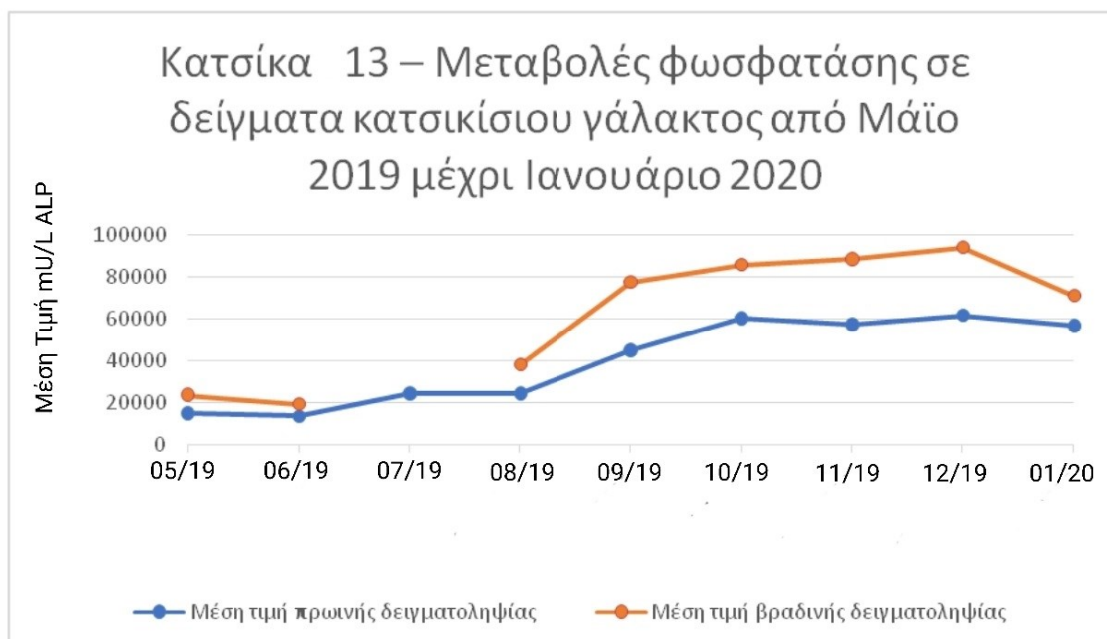
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	20857,5	15195,6
6 ^{ος} 2019	27404,1	32605,2
7 ^{ος} 2019	58510,8	-
8 ^{ος} 2019	76001,4	98802,9
9 ^{ος} 2019	88213,5	130831,2
10 ^{ος} 2019	83763,9	109142,1
11 ^{ος} 2019	145111,5	252621
12 ^{ος} 2019	-	-
1 ^{ος} 2020	-	-



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ43

Κατσίκια 13 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

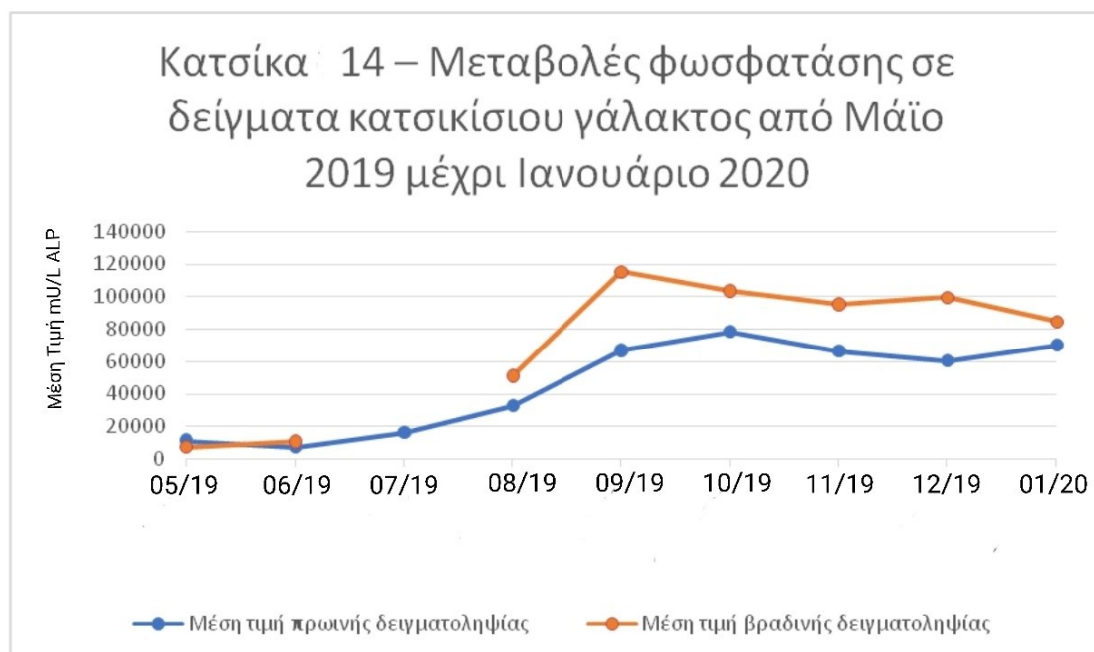
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	14979,6	23400,9
6 ^{ος} 2019	13551,3	19016,1
7 ^{ος} 2019	24295,5	-
8 ^{ος} 2019	24154,2	37754,1
9 ^{ος} 2019	44766	77186,7
10 ^{ος} 2019	59861,7	85500,9
11 ^{ος} 2019	57055,5	88083
12 ^{ος} 2019	61272	93591
1 ^{ος} 2020	56301,3	70885,8



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ44

Κατσικά 14 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάϊο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

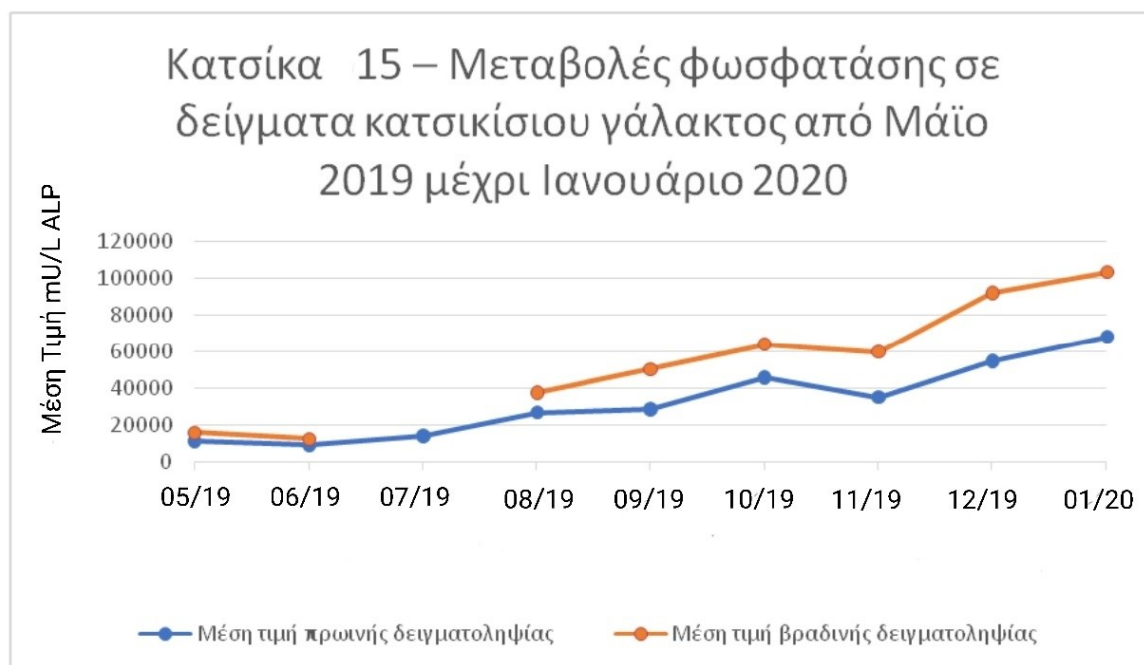
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	11134,8	7126,2
6 ^{ος} 2019	7099,2	10502,1
7 ^{ος} 2019	15921,9	-
8 ^{ος} 2019	32400,9	50935,5
9 ^{ος} 2019	66429	115069,5
10 ^{ος} 2019	77959,8	103456,8
11 ^{ος} 2019	66140,1	95184
12 ^{ος} 2019	60094,8	99529,2
1 ^{ος} 2020	69921	84476,7



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ45

Κατσικά 15 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	11255,4	16162,2
6 ^{ος} 2019	9171	12776,4
7 ^{ος} 2019	14050,8	-
8 ^{ος} 2019	26644,5	37643,4
9 ^{ος} 2019	28323,9	50454
10 ^{ος} 2019	45715,5	63998,1
11 ^{ος} 2019	34797,6	59925,6
12 ^{ος} 2019	54447,3	91855,8
1 ^{ος} 2020	67590	102970,8



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ46

Κατσίκια 16 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάϊο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

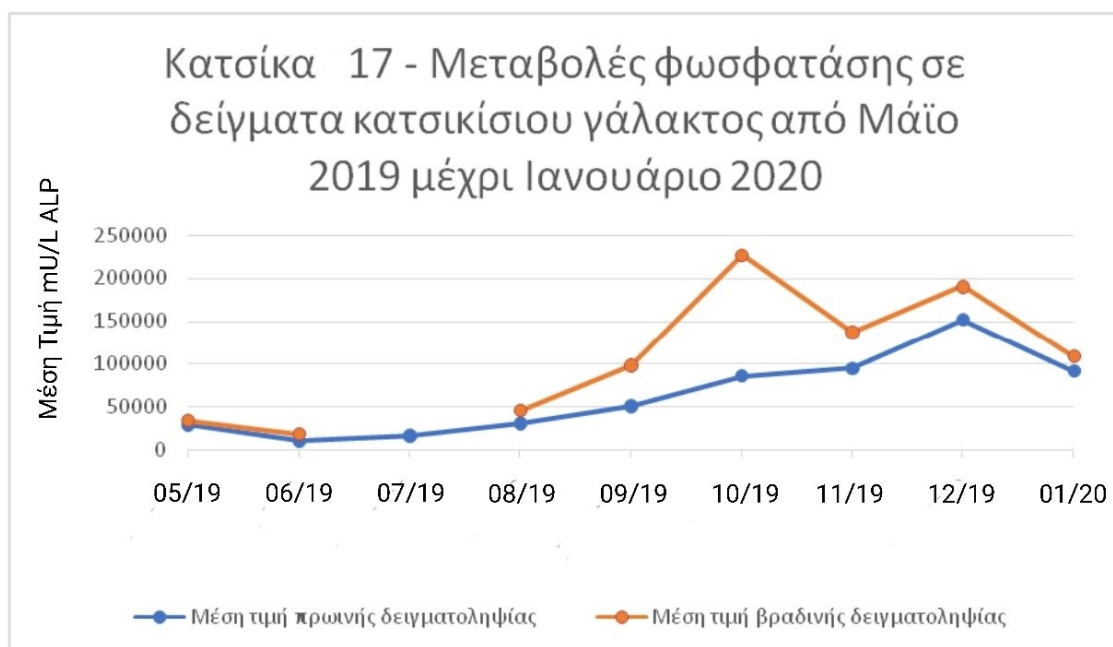
Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	162812,7	218515,5
6 ^{ος} 2019	383606,1	568453,5
7 ^{ος} 2019	383865,3	-
8 ^{ος} 2019	274810,5	247585,5
9 ^{ος} 2019	-	-
10 ^{ος} 2019	-	-
11 ^{ος} 2019	-	-
12 ^{ος} 2019	-	-
1 ^{ος} 2020	-	-



ΠΙΝΑΚΑΣ Δ47

Κατσικά 17 – Μεταβολές φωσφατάσης σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από Μάιο 2019 μέχρι Ιανουάριο 2020

Μήνας – Έτος	Μέση τιμή πρωινής δειγματοληψίας (mU/L)	Μέση τιμή βραδινής δειγματοληψίας (mU/L)
5 ^{ος} 2019	28350,9	33439,5
6 ^{ος} 2019	10001,7	18235,8
7 ^{ος} 2019	16448,4	-
8 ^{ος} 2019	30589,2	45489,6
9 ^{ος} 2019	50688	97729,2
10 ^{ος} 2019	85458,6	226642,5
11 ^{ος} 2019	94777,2	136665
12 ^{ος} 2019	151516,8	190271,7
1 ^{ος} 2020	91131,3	108451,8



9.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοπτικά, τα κυριότερα συμπεράσματα της παρούσας διατριβής είναι:

- Το τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» είναι το πιο ευαίσθητο τεστ ανίχνευσης φωσφατάσης, άκρως σύγχρονο, και έρχεται να καλύψει τις ανάγκες της παγκόσμιας ζήτησης για ένα τεστ σύγχρονο, οικονομικά προσιτό (χωρίς χρήση συνοδού εξοπλισμού), υπερευαίσθητο, εύκολο στη χρήση, γρήγορο που μπορεί να γίνει οπουδήποτε, κάτω από ακραίο θερμοκρασιακό εύρος. Μετά την ανάλυση που έγινε μεταξύ του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» και όλων των υπολοίπων τεστ που εμπορεύονται οι εταιρείες παγκοσμίως, αποδείχτηκε ότι το όριο ευαισθησίας ανίχνευσης φωσφατάσης στο παστεριωμένο γάλα για το τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» είναι στα 3,5 mU / L ενώ το αμέσως επόμενο ευαίσθητο τεστ είναι της εταιρείας CHARM στα 20 mU / L. Με την εισαγωγή του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» στην πραγματική διαδικασία διαχείρισης γάλακτος, θα ελαχιστοποιηθούν οποιεσδήποτε βακτηριακές μολυσματικές εξάρσεις και τα τελικά γαλακτοκομικά προϊόντα θα είναι άριστης ποιότητας με γνώμονα το καλό του καταναλωτή
- Λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο που χάνεται καθημερινά σε μια τυροκομική μονάδα, από τη στιγμή που τελειώνει η διαδικασία της παστερίωσης μέχρι να βγει το αποτέλεσμα της σωστής ή μη παστερίωσης, ο οποίος φτάνει τα 60 min με τα υπόλοιπα τεστ, η χρήση του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» παρέχει στην κάθε τυροκομική μονάδα εξήντα (60) επιπλέον λεπτά στην παραγωγική διαδικασία. Άμεση συνέπεια αυτού είναι το κέρδος σε εργατοώρες, αύξηση παραγωγής τελικών προϊόντων, μείωση κόστους κατανάλωσης ηλεκτρικής ενέργειας στην τυροκομική μονάδα αλλά και βέλτιστη διαχείριση και κατανομή εργατικού δυναμικού. Αν το αθροίσουμε μόνο ως ποσότητα αύξησης χρόνου παραγωγικής διαδικασίας ετησίως, αυτό συνεπάγεται τριακόσιες εξηταπέντε (365) ημέρες x μία (1) ώρα (δεχόμενοι a priori ότι μια μικρή τυροκομική μονάδα παστεριώνει δεκαπέντε (15) τόνους γάλα ημερησίως = 365 ώρες κερδισμένες που προστίθενται ετησίως στην παραγωγική διαδικασία
- Το τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» είναι το μόνο τεστ που δοκιμάστηκε επιτυχώς σε θερμοκρασίες δωματίου αλλά και σε εξωτερικές θερμοκρασίες περιβάλλοντος και σε εύρος από 2 °C μέχρι 42 °C. Άρα, δεν υφίσταται γεωγραφικός περιορισμός πρακτικά

που να συσχετίζεται με θερμοκρασίες περιοχής, με ότι αυτό συνεπάγεται για την εμπορική εκμετάλλευσή του και τις εφαρμογές που ανοίγονται με το τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ». Με το τεστ αυτό απλοποιείται η εργασία του τεχνολόγου τροφίμων και του χημικού της κάθε τυροκομικής μονάδας.

- Για την πραγματοποίηση του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» δεν απαιτείται κανένας ειδικός εξοπλισμός (όπως φυγοκέντρους, λουμινόμετρα, φασματοφωτόμετρα, υδατόλουτρα, πλάκες Peltier). Το μόνο που απαιτείται είναι τρεις (3) πιπέτες μεταβλητού όγκου 0,5 - 10 μl, 10 - 100 μl, 100 - 1000 μl. Αυτό συνεπάγεται θεαματική μείωση κόστους επένδυσης για την κάθε τυροκομική μονάδα σε κεφάλαια για την πραγματοποίηση της εξέτασης και την καθιστά προσιτή οικονομικά για όλα τα μεγέθη των τυροκομικών μονάδων ως τεχνολογία αιχμής προσιτή σε όλους.
- Το τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» δοκιμάστηκε με 100% ακρίβεια αποτελεσμάτων για δύο (2) χρόνια με επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων στο 100%, σε τέσσερις (4) διαφορετικές τυροκομικές - γαλακτοκομικές μονάδες ανά την Ελλάδα που ανήκουν γεωγραφικά σε διαφορετικές περιφέρειες. Ο λόγος που έγινε αυτό ήταν για να πιστοποιηθεί η ακρίβεια του τεστ σε όλες τις διαφορετικές μεταβλητές (είδος γάλακτος, είδος προϊόντος, θερμοκρασιακές διακυμάνσεις από περιοχή σε περιοχή, είδος τροφής του αναπαραγωγικού ζώου, διαφορετικές ποικιλίες ζώων ανά είδος, διαφορετική συγκέντρωση λιπαρών στο νωπό γάλα, χρονική περίοδο λήψης γάλακτος). Οι εφαρμογές του τεστ αυτού μπορούν να το καταστήσουν ένα ιδανικό προϊόν εξαγωγικής δραστηριότητας 100% ελληνικής προέλευσης και τεχνογνωσίας.
- Ως επίλογο, προτείνεται η χρήση του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» ως η πιο έγκυρη μέθοδος ανίχνευσης σωστής παστερίωσης γάλακτος λόγω της ευαισθησίας του, της επαναληψιμότητάς του, της ευκολίας του καθώς επίσης και ως μέθοδος φιλική προς τον τεχνολόγο τροφίμων ή τον χημικό του εργαστηρίου, του οικονομικού οφέλους που παρέχει στην κάθε τυροκομική μονάδα και ότι χάρη στα χαρακτηριστικά που έχει, μπορεί να σταθεί σε κάθε γεωγραφικό σημείο της υφελίου.

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ48: Πλεονεκτήματα του τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ» συγκριτικά με άλλα τεστ εταιρειών που κυκλοφορούν στο εμπόριο.

Εταιρεία/ Παράμετρος	Τεστ «ΛΑΚΤΟΦΩΣΦΑΤΑΣΗ »	CHARM F-AP	CHARM PASLite	SENS OBIZ APT	MACHE REY- NAGEL Phosph atesmo MI	BIOO SCIENTI FIC MaxSig nal	Heyl Lactognost III	HARDY Alkaline Phosphatase	HYGIENA ZymoSnap
	Όχι	Όχι	3 min	Όχι	60 min	30 min	60 min	30-60 min	10 min στους 20-25 °C + 5 min στους 37 °C
E Επώαση									
Χρόνος αποτελέσματος	5 sec	45 - 90 sec	45-90 sec	5-10 min	Διαβάζο νται τα αποτελ έσματα μετά την επώασ η	Διαβάζο νται τα αποτελ έσματα μετά την επώασ η	10 min μετά το τέλος της επώασης	Διαβάζονται τα αποτελέσματα μετά την επώαση	Διαβάζονται τα αποτελέσματα μετά την επώαση
Θερμοκρασία (σε °C)	2-42 °C, λειτουργεί σε εργασιακά περιβάλλοντα και εκτός εργαστηρίου	Θερμοκρ ασία δωματίου	Θερμοκρ ασία δωματίου	Θερμ οκρα σία δωμα τίου	36 °C	37°C	37 °C	37 °C	Θερμοκρασία δωματίου
Απαραίτητος εξοπλισμός	Όχι	Λουμινόμ ετρο, φυγόκεντ ρος	Λουμινόμ ετρο, φυγόκεντ ρος, φασματοφ ωτόμετρο	Όχι	Επωαστ ήρας	Επωαστ ήρας	Επωαστήρας, φυγόκεντρος, υδατόλουτρο	Υδατόλουτρο επωαστήρας	Λουμινόμετρο υδατόλουτρο
Όριο ευαισθησίας	3,5 mU/L	20 mU/L	20 mU/L	120 mU/L	1750 mU/L	700 mU/L	350 mU/L	700 mU/L	222 mU/L
Δείγματα	Παστεριωμένο γάλα, HTST, σοκολατούχο γάλα, κρέμα γάλακτος, ορρός γάλακτος, τυρί, βούτυρο	HTST, σοκολατο ύχο γάλα, κρέμα γάλακτος	HTST, σοκολατο ύχο γάλα, κρέμα γάλακτος	Παστε ριωμέ νο γάλα, HTST	Παστερ ιωμένο γάλα	Παστερ ιωμένο γάλα, τυρί	Παστεριωμένο γάλα, ορρός γάλακτος, κρέμα βούτυρο	Παστεριωμένο γάλα, βούτυρο, κρέμα γάλακτος, τυρί	Παστεριωμένο γάλα, κρέμα γάλακτος, HTST

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 2

10.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χημική σύνθεση και η ποιότητα της υγιεινής είναι υψίστης σημασίας για τη δημόσια υγεία, την τεχνολογία επεξεργασίας και την ποιότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων. Σκοπός αυτού του πειραματικού μέρους ήταν να δημιουργηθούν συσχετισμοί μεταξύ της εποχής, του συνολικού αριθμού μικροβίων και του αριθμού σωματικών κυττάρων του αγελαδινού γάλακτος ως δείκτες για την ποιότητα της υγιεινής του γάλακτος και να δοκιμαστεί το νεοσύστατο kit SOMATOMIC ως εναλλακτικός τρόπος μέτρησης της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX) και των ολικών σωματικών σε δείγματα κυττάρων νοπού γάλακτος. Έγιναν έρευνες σε 1200 δείγματα γάλακτος που συλλέχθηκαν από την εγχώρια αγορά. Τα δείγματα γάλακτος συλλέχθηκαν κατά τους μήνες Δεκέμβριο 2016 – Νοέμβριο 2017 από 3 δείγματα, τουλάχιστον την ημέρα. Ο συνολικός αριθμός μικροβίων και αριθμών σωματικών κυττάρων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας πρότυπες μεθόδους κλασσικής μικροβιολογίας στα βιοχημικά εργαστήρια Παρμακλή Ε.Ε.- Λάρισα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο ISO 4833-1- 2013. Όλοι οι προσδιορισμοί υποβλήθηκαν σε στατιστική επεξεργασία με ανάλυση κύριας συνιστώσας (PCA). Οπότε προέκυψε το συμπέρασμα ότι η εποχή έχει επιρροή στον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο γάλα και τη σύνθεση του γάλακτος. Ο αριθμός σωματικών κυττάρων ήταν ο υψηλότερος την άνοιξη (λίγο πάνω από το μέγιστο όριο) και ο χαμηλότερος το χειμώνα και στις αρχές του φθινοπώρου. Αυτό καταδεικνύει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της μαστίτιδας κατά τη διάρκεια της καυτής περιόδου παρά σε ψυχρή περίοδο. Στη συνέχεια, έχοντας ως βάση τα δεδομένα αυτά, κάθε μέρα, γινόταν μέτρηση των δειγμάτων με το kit SOMATOMIC που έδινε ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα με τις πρότυπες μεθόδους κλασσικής μικροβιολογίας, αλλά σε χρόνο 15-60 sec.

Οι βασικοί δείκτες υγιεινής ποιότητας για το νοπό αγελαδινό γάλα είναι ο συνολικός αριθμός των μικροβίων (OMX) και ο αριθμός σωματικών κυττάρων. Έχουν συμφωνηθεί τα ακόλουθα πρότυπα Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ): OMX 100.000 (CFU / mL) και Α.Σ.Κ. 400.000 (κύτταρα / mL). Η ποιότητα του γάλακτος δεν σχετίζεται με την περιεκτικότητα του λίπους και της πρωτεΐνης αλλά με τις ακόλουθες παραμέτρους: βακτήρια και σωματικά κύτταρα, ανασταλτικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών. Όλοι οι παράγοντες που βλάπτουν το γάλα, χαρακτηρίζονται πάντοτε ως μεταβλητές στην ποιότητα του γάλακτος.

Η σύνθεση του γάλακτος, δηλ. η ποιότητα του αγελαδινού γάλακτος μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες όπως: γενετικοί παράγοντες, κατάσταση της υγείας, περίοδος γαλουχίας, τρόπος και τύπος διατροφής, εποχή, τρόπος αρμέγματος, καθώς και η ηλικία και ο συνολικός αριθμός της γαλουχίας ακόμη και περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Η παράμετρος των σωματικών κυττάρων χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης για την κατάσταση υγείας του μαστού, έτσι ώστε ο αριθμός σωματικών κυττάρων να αναγνωρίζεται ως διεθνές πρότυπο για την ποιότητα του γάλακτος. Με την αύξηση του αριθμού σωματικών κυττάρων (ΑΣΚ) πάνω από 400.000 / mL, το γάλα μεταβάλλεται και οι συνέπειες μεταφράζονται σε χαμηλότερη έκκριση, αλλοιώσεις στη φυσικοχημική σύνθεση και στα βακτηριολογικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά του γάλακτος. Η μέτρηση σωματικών κυττάρων στα δείγματα γάλακτος υγείων αγελάδων που δεν έχουν μαστίτιδα είναι συνήθως μικρότερη από 200.000 / mL, ενώ οι περισσότερες αγελάδες έχουν αριθμό σωματικών κυττάρων μικρότερο από 100.000 / mL. Ο αριθμός σωματικών κυττάρων που είναι υψηλότερος από 200.000 / mL είναι δείκτης μαστίτιδας. Στην περίπτωση αυτή, τα περισσότερα σωματικά κύτταρα είναι ουδετερόφιλα. Ο οργανισμός αντιδρά με έναν αμυντικό μηχανισμό ενάντια σε ερεθιστικούς παράγοντες με αυξημένο αριθμό κυττάρων (ειδικά πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα), οπότε ο αυξημένος αριθμός τους σε οποιαδήποτε περιοχή των μαστών εμφανίζει διαταραγμένη έκκριση. Το κιτ SOMATOMIC πήζει όλα τα έμμορφα στοιχεία σε δευτερόλεπτα και ανάλογα τη συγκέντρωσή τους στο κάθε δείγμα γάλακτος, οι μεταβλητές χρόνος, συγκέντρωση σωματικών κυττάρων και εμμέσως, ο αριθμός της OMX άλλαξε. Αλλά σε κάθε περίπτωση δείγματος, ταυτίστηκαν τα αποτελέσματα που βγήκαν από την κλασσική μικροβιολογία με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από το κιτ SOMATOMIC.

10.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Aⁿ ΦΑΣΗ

Υλικά:

Έγιναν έρευνες σε 1200 δείγματα γάλακτος που συλλέχθηκαν από την εγχώρια αγορά. Τα δείγματα ελήφθησαν από τη δεξαμενή όγκου, αμέσως μετά το πρωινό γάλα, με ποσότητα 500 mL σε αποστειρωμένα μπουκάλια και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Κατά τη μεταφορά τα δείγματα γάλακτος διατηρήθηκαν σε τσάντα ψύξης. Τα δείγματα γάλακτος συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των μηνών Δεκέμβριος 2016 – Νοέμβριος 2017, τουλάχιστον τρία δείγματα τη μέρα.

Προσδιορισμός OMX και ΑΣΚ:

Ο συνολικός αριθμός μικροβίων (OMX) είναι ένας πολύ σημαντικός γενικός μικροβιολογικός δείκτης υγιεινής. Η OMX προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την οριζόντια μέθοδο για την απαρίθμηση μικροοργανισμών - Τεχνική καταμέτρησης αποικιών στους 30 °C, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 4833-1/2013. Από το ίδιο δείγμα ο αριθμός σωματικών κυττάρων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το όργανο LACTOSCAN και τον αναλυτή Electra m2 (Εικόνα 24).



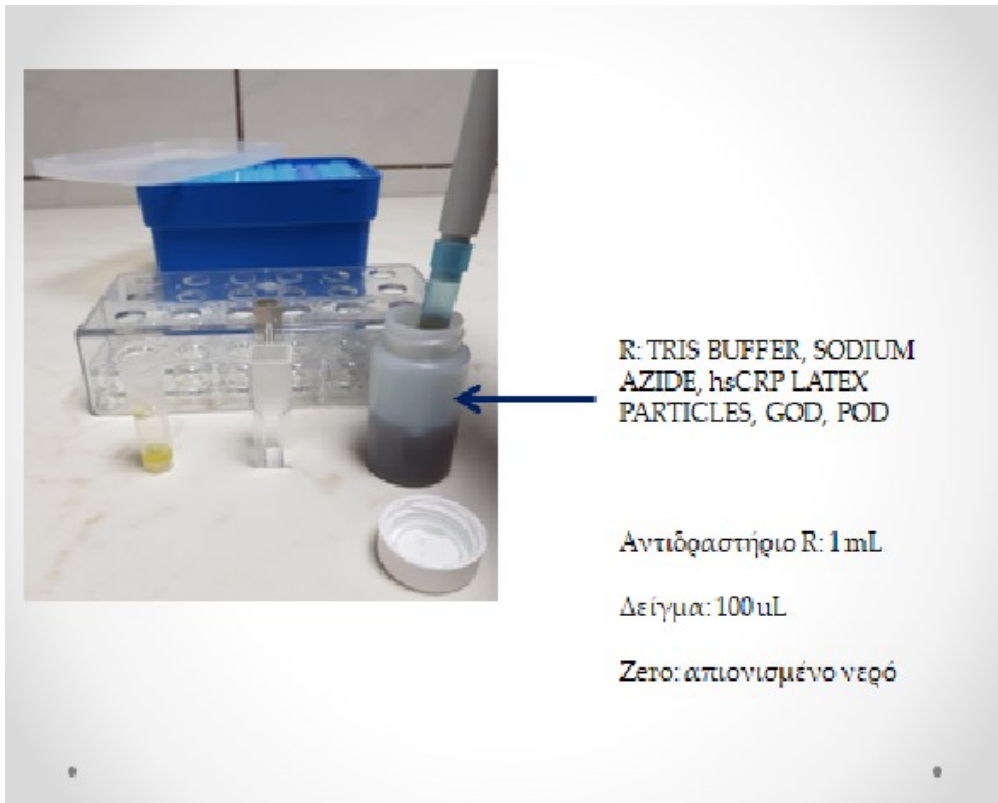
Εικόνα 24: Αναλυτής Electra m2

B^η ΦΑΣΗ

Αφού κάθε μέρα ήταν δεδομένη η λήψη τουλάχιστον 3 δειγμάτων και στη συνέχεια είχαμε τις τιμές των OMX και σωματικών κυττάρων γνωστές για κάθε δείγμα, προχωρούσαμε στη μέτρηση εκ νέου των δειγμάτων αυτών σε αναλυτή πήξεως KC-1 με την προσθήκη 200 μl αντιδραστηρίου σε 100 μl γάλα. Ο χρόνος που απαιτούνταν για την πήξη του γάλακτος καταγράφονταν και εξισώνονταν με τις αντίστοιχες τιμές των σωματικών κυττάρων και της OMX του δείγματος. Έτσι, με αυτόν τον τρόπο, δημιουργήθηκε μια καμπύλη βαθμονόμησης με μεγάλο και επαρκές εύρος δειγμάτων που ταυτοποίησε τη σχέση της OMX και των σωματικών κυττάρων ανάλογα με την εποχή. Επειδή τους ζεστούς μήνες η μεταβλητή θερμοκρασία επηρεάζει τους πληθυσμούς OMX και σωματικών κυττάρων, έγιναν 12 πίνακες για τη σωστή μέτρηση με τη μέθοδο του kit SOMATOMIC (Εικόνες 25, 26 και 27), ένας για κάθε μήνα.

Ανάλυση αποτελεσμάτων με γραφήματα:

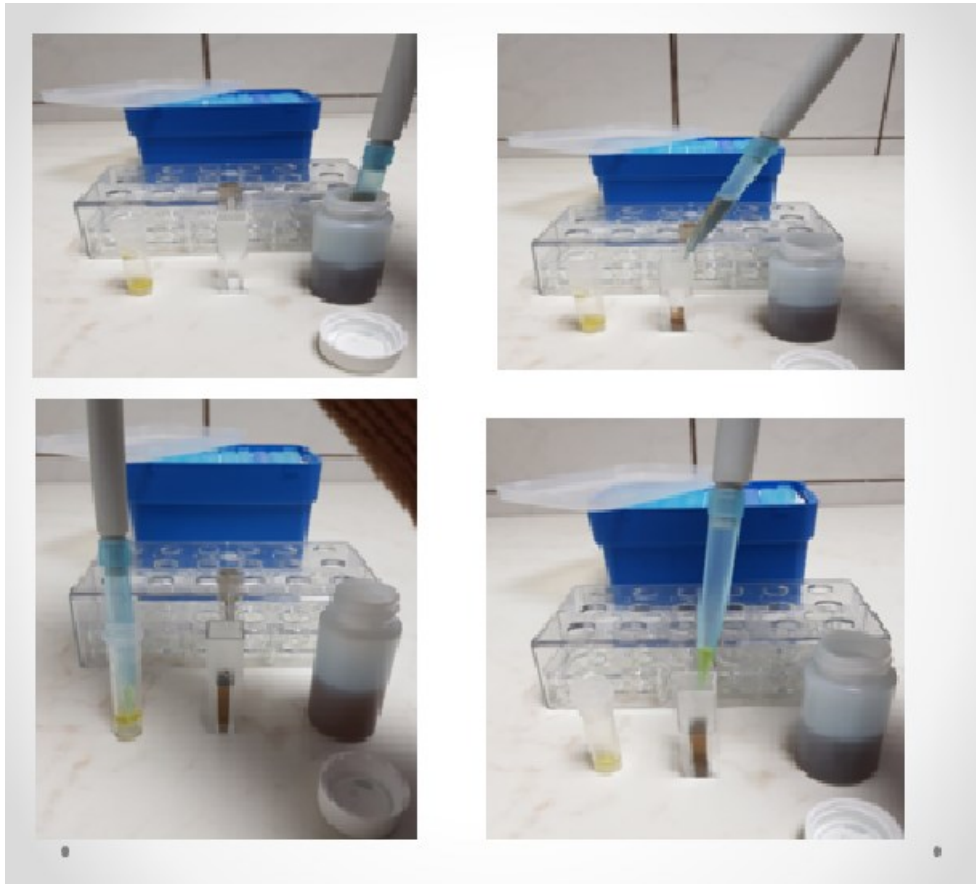
1. Ανά εποχές:
 - i. Κάθε μήνας της εποχής αναλυτικά.
 - ii. Μέσος όρος OMX και σωματικών κυττάρων ανά 10 δείγματα ομαδοποιημένα ανά 3 ημέρες λήψης.
2. Μέσος όρος OMX – σωματικών κυττάρων ανά μήνα σε ετήσιο γράφημα.
3. Πίνακες βαθμονόμησης (Δ49, Δ50, Δ51, Δ52, Δ53, Δ54, Δ55, Δ56, Δ57, Δ58, Δ59, Δ60) ανά μήνα.



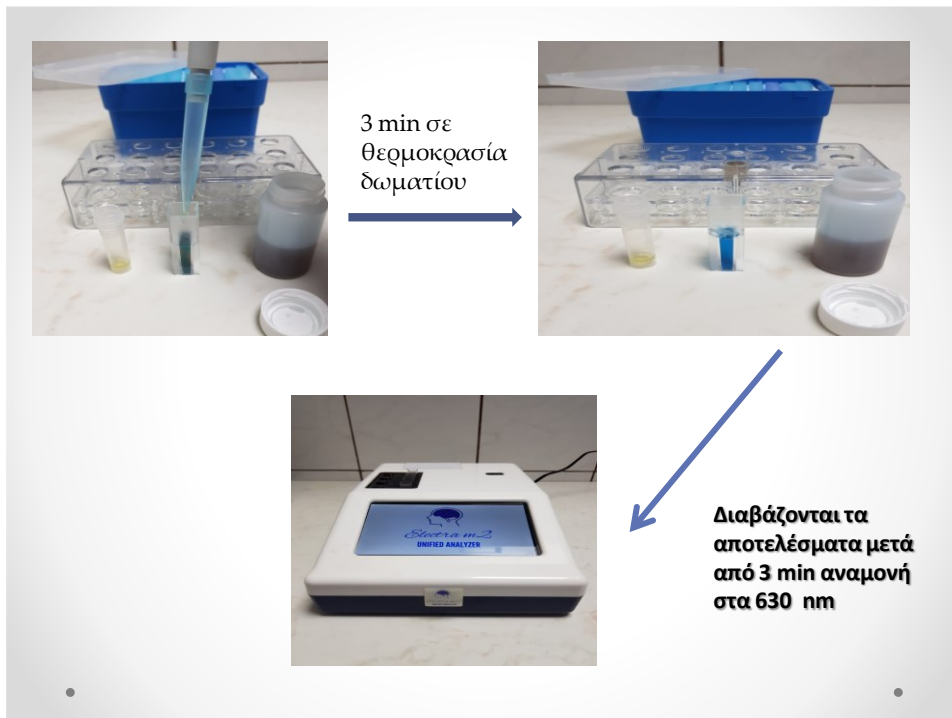
Εικόνα 25: Προετοιμασία των αντιδραστηρίων του κιτ SOMATOMIC

Αναλυτικά η διαδικασία μεθόδου του κιτ SOMATOMIC:

1. Το υπό εξέταση δείγμα γάλακτος, φυγοκεντρείται στα 800RCF για **10 min**.
2. Λαμβάνεται το υπερκείμενο μετά την φυγοκέντρηση και τοποθετείται σε σωληνάριο.
3. Σε μια άδεια κυβέττα, προστίθενται **1ml** από το αντιδραστήριο **R**.
4. Προστίθενται **100 μ l** στην παραπάνω κυβέττα από το προς εξέταση δείγμα γάλακτος.
5. Αφήνεται η κυβέττα με το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου για **3min**.
6. Τέλος, διαβάζεται το αποτέλεσμα στα **630nm** του αναλυτή Electra.



Εικόνα 26: Τα βήματα εκτέλεσης του κιτ SOMATOMIC.



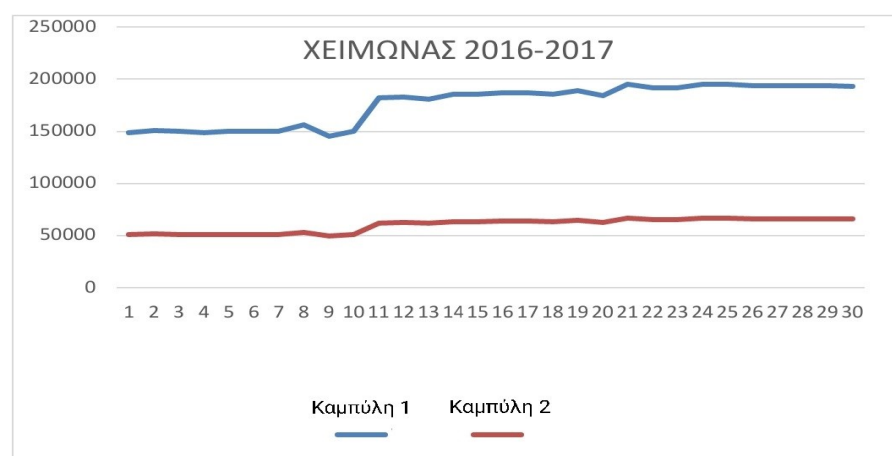
Εικόνα 27: Ανάγνωση των αποτελεσμάτων του κιτ SOMATOMIC.

Ο μέσος όρος των ολικών σωματικών κυττάρων για την περίοδο του χειμώνα **Δεκέμβριος 2016 – Φεβρουάριος 2017** ήταν 176.216,66 και ο αντίστοιχος μέσος όρος της ΟΜΧ για την ίδια περίοδο ήταν 60.143,36.

ΧΕΙΜΩΝΑΣ 2017

Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
148900	50820	187000	63830
151000	51540	187000	63827
150000	51195	185500	63316
148900	50820	189200	64575
149800	51130	184000	62800
150000	51193	195000	66550
150000	51193	192000	65530
156000	53244	192000	65534
145000	49485	195000	66548
150000	51195	195000	66553
182000	62118	193800	66145
183000	62458	193750	66122
181000	61775	193750	66125
185500	63320	193750	66125
185500	63315	193150	65920

ΧΕΙΜΩΝΑΣ 2016-2017

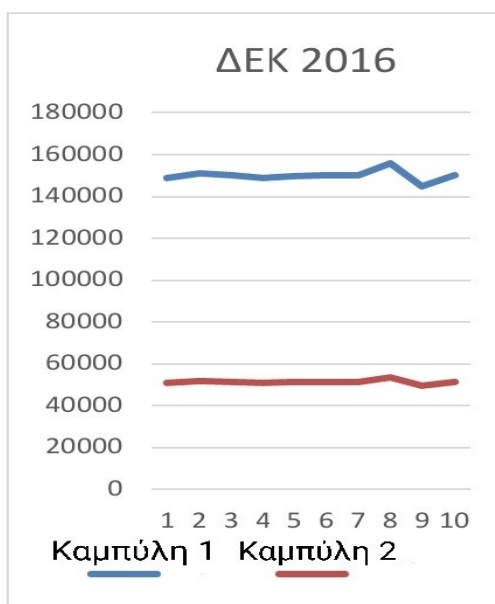


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Ειδικότερα, για τον μήνα Δεκέμβριο 2016 τα αποτελέσματα ήταν:

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2016		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	148900	50820
11-20	151000	51540
21-30	150000	51195
31-40	148900	50820
41-50	149800	51130
51-60	150000	51193
61-70	150000	51193
71-80	156000	53244
81-90	145000	49485
91-100	150000	51195

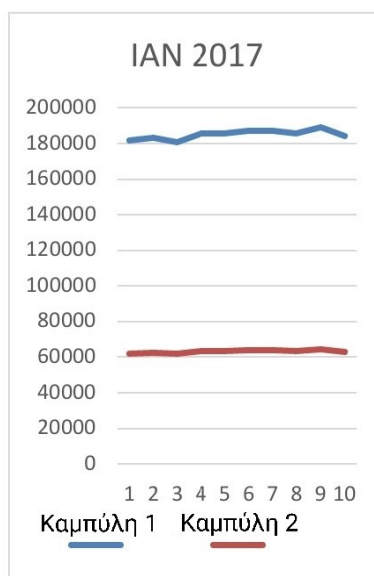


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Για τον μήνα Ιανουάριο 2017 τα αποτελέσματα ήταν:

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2017		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	182000	62118
11-20	183000	62458
21-30	181000	61775
31-40	185500	63320
41-50	185500	63315
51-60	187000	63830
61-70	187000	63827
71-80	185500	63316
81-90	189200	64575
91-100	184000	62800

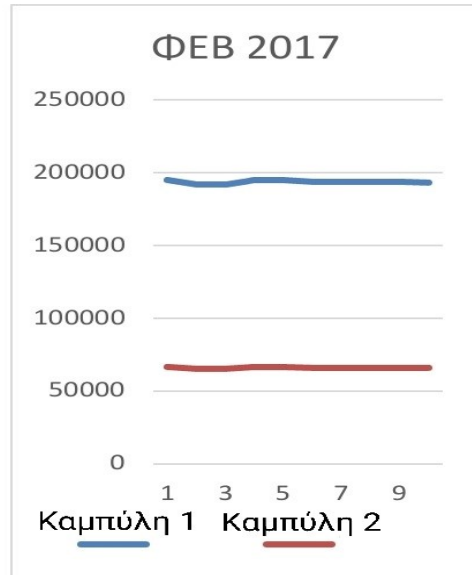


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Για τον μήνα Φεβρουάριο 2017 τα αποτελέσματα ήταν:

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2017		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	195000	66550
11-20	192000	65530
21-30	192000	65534
31-40	195000	66548
41-50	195000	66553
51-60	193800	66145
61-70	193750	66122
71-80	193750	66125
81-90	193750	66125
91-100	193150	65920

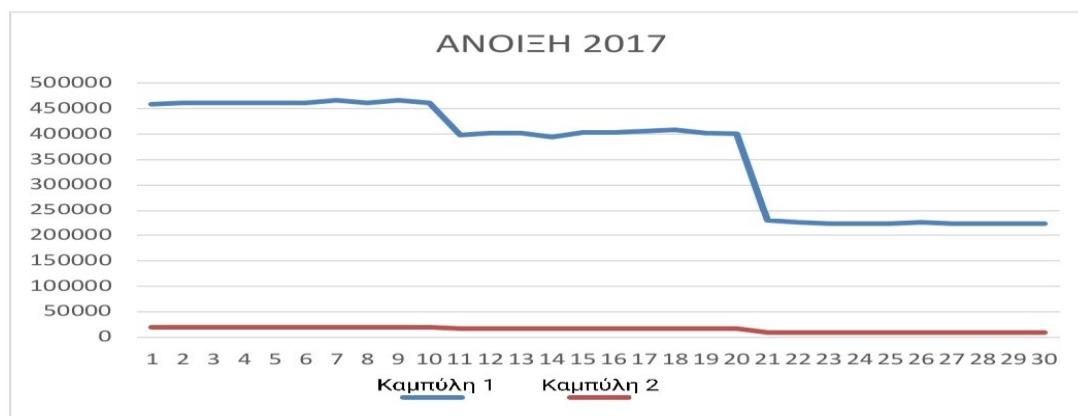


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ)
 Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Ο μέσος όρος των ολικών σωματικών κυττάρων για την περίοδο της άνοιξης, δηλαδή Μάρτιος 2017-Μάιος 2017 ήταν 362.723,33 και ο αντίστοιχος μέσος όρος της OMX για την ίδια περίοδο ήταν 15.567,7.

ΑΝΟΙΞΗ 2017

Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
459000	19692	406400	17436
461000	19778	408000	17504
461000	19778	402000	17247
461000	19778	401000	17204
461000	19778	230000	9868
461000	19778	226000	9696
466000	19993	223000	9567
461300	19971	223000	9567
466000	19993	223000	9567
461000	19778	226000	9697
398000	17075	223000	9566
402000	17247	223000	9566
402000	17247	223000	9567
395000	16947	223000	9566
403000	17290		
403000	17290		

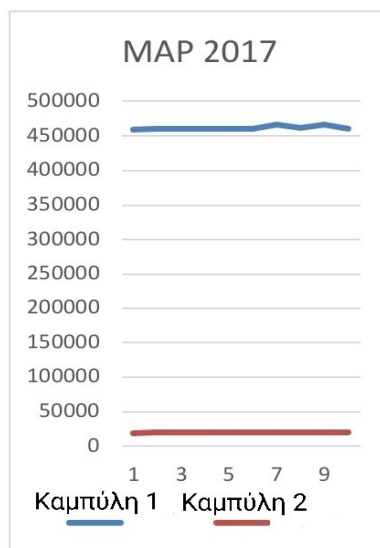


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Για τον μήνα Μάρτιο 2017 τα αποτελέσματα ήταν:

ΜΑΡΤΙΟΣ 2017		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	459000	19692
11-20	461000	19778
21-30	461000	19778
31-40	461000	19778
41-50	461000	19778
51-60	461000	19778
61-70	466000	19993
71-80	461300	19971
81-90	466000	19993
91-100	461000	19778

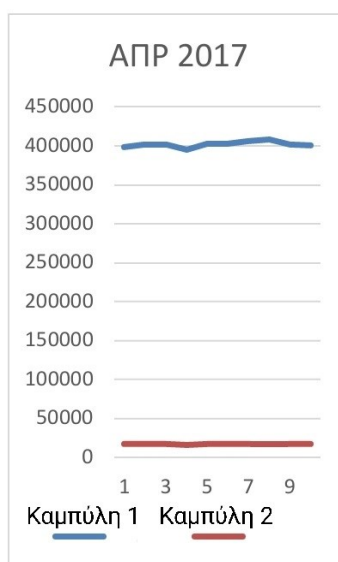


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Για τον μήνα Απρίλιο 2017 τα αποτελέσματα ήταν:

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2017		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	398000	17075
11-20	402000	17247
21-30	402000	17247
31-40	395000	16947
41-50	403000	17290
51-60	403000	17290
61-70	406400	17436
71-80	408000	17504
81-90	402000	17247
91-100	401000	17204

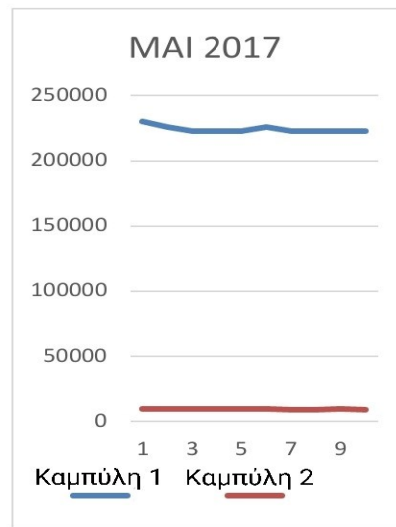


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Για τον μήνα Μαΐο 2017 τα αποτελέσματα ήταν:

ΜΑΙΟΣ 2017		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	230000	9868
11-20	226000	9696
21-30	223000	9567
31-40	223000	9567
41-50	223000	9567
51-60	226000	9697
61-70	223000	9566
71-80	223000	9566
81-90	223000	9567
91-100	223000	9566



Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ 2017

Ο μέσος όρος των ολικών σωματικών κυττάρων για την περίοδο του καλοκαιριού, δηλαδή Ιούνιος 2017-Αύγουστος 2017 ήταν 247.428,33 και ο αντίστοιχος μέσος όρος της ΟΜΧ για την ίδια περίοδο ήταν 52.767,66.

ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ 2017

Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
142000	30283	258000	55023
142000	30283	241000	51397
139000	29644	248000	52890
142000	30284	242000	51610
142000	30284	241400	51482
142000	30284	357250	76189
142000	30283	357000	76136
142000	30283	357000	76135
142000	30283	357000	76135
141300	30135	355600	75837
242000	51610	357000	76135
242000	51610	357000	76135
242000	51610	357000	76135
241300	51461	355000	75709
242000	51610	357000	76135

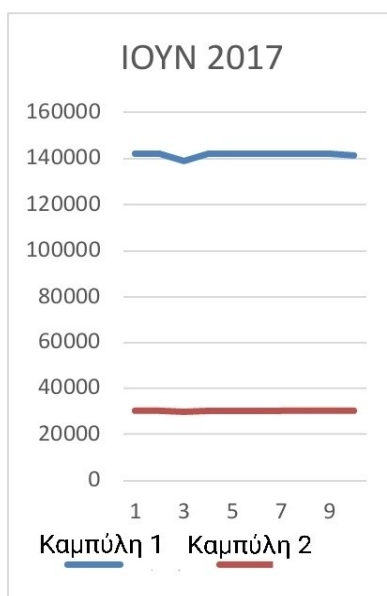


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Για τον μήνα Ιούνιο 2017 τα αποτελέσματα ήταν:

ΙΟΥΝΙΟΣ 2017		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	142000	30283
11-20	142000	30283
21-30	139000	29644
31-40	142000	30284
41-50	142000	30284
51-60	142000	30284
61-70	142000	30283
71-80	142000	30283
81-90	142000	30283
91-100	141300	30135

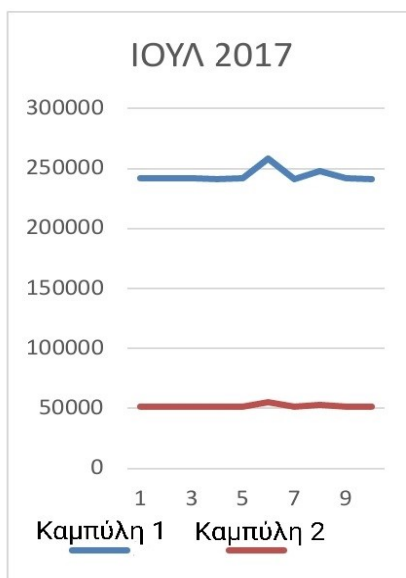


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Για τον μήνα Ιούλιο 2017 τα αποτελέσματα ήταν:

ΙΟΥΛΙΟΣ 2017		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	242000	51610
11-20	242000	51610
21-30	242000	51610
31-40	241300	51461
41-50	242000	51610
51-60	258000	55023
61-70	241000	51397
71-80	248000	52890
81-90	242000	51610
91-100	241400	51482

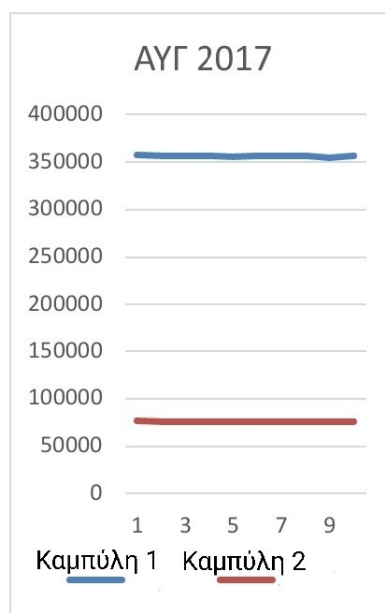


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Για τον μήνα Αύγουστο 2017 τα αποτελέσματα ήταν:

ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2017		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	357250	76189
11-20	357000	76136
21-30	357000	76135
31-40	357000	76135
41-50	355600	75837
51-60	357000	76135
61-70	357000	76135
71-80	357000	76135
81-90	355000	75709
91-100	357000	76135



Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)
 Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ 2017

Ο μέσος όρος των ολικών σωματικών κυττάρων για την περίοδο του φθινοπώρου, δηλαδή Σεπτέμβριος 2017-Νοέμβριος 2017 ήταν 225.540 και ο αντίστοιχος μέσος όρος της OMX για την ίδια περίοδο ήταν 46.919,70.

ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ 2017

Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
182000	37861	205000	42646
183000	38070	205000	42647
181000	37653	205000	42646
185500	38590	205000	42645
185500	38589	205000	42648
177400	36905	286500	59600
187000	38902	287000	59705
180400	37529	287000	59710
189200	39359	287000	59702
184000	38278	287000	59707
204300	42501	287100	59725
205000	42646	287000	59707
203400	42313	290000	60330
205000	42646	287000	59710
214000	44518	288900	60103

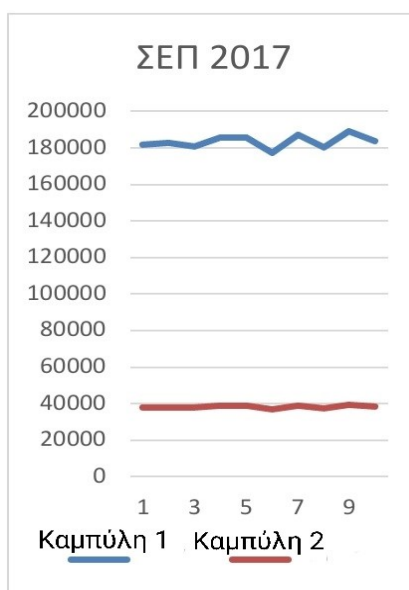


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Για τον μήνα Σεπτέμβριο 2017 τα αποτελέσματα ήταν:

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2017		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	182000	37861
11-20	183000	38070
21-30	181000	37653
31-40	185500	38590
41-50	185500	38589
51-60	177400	36905
61-70	187000	38902
71-80	180400	37529
81-90	189200	39359
91-100	184000	38278

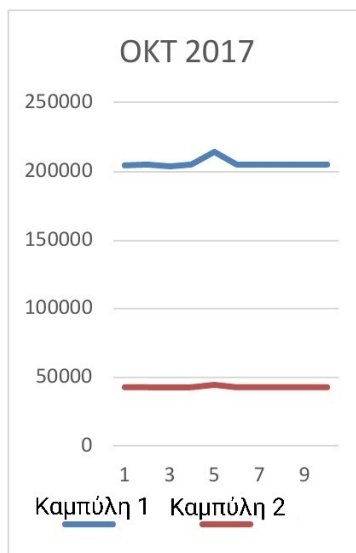


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Για τον μήνα Οκτώβριο 2017 τα αποτελέσματα ήταν:

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2017		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	204300	42501
11-20	205000	42646
21-30	203400	42313
31-40	205000	42646
41-50	214000	44518
51-60	205000	42646
61-70	205000	42647
71-80	205000	42646
81-90	205000	42645
91-100	205000	42648

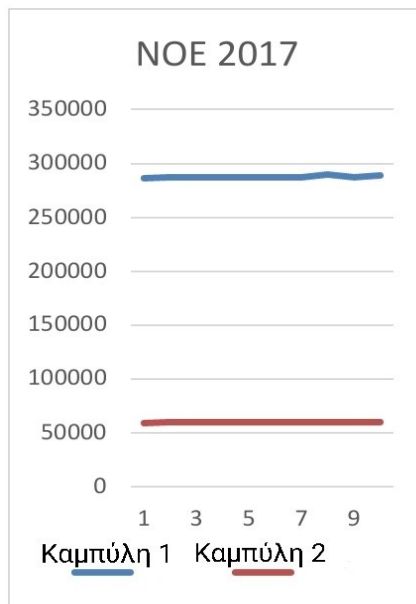


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

Για τον μήνα Νοέμβριο 2017 τα αποτελέσματα ήταν:

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2017		
Αρ. δειγμάτων	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
1-10	286500	59600
11-20	287000	59705
21-30	287000	59710
31-40	287000	59702
41-50	287000	59707
51-60	287100	59725
61-70	287000	59707
71-80	290000	60330
81-90	287000	59710
91-100	288900	60103

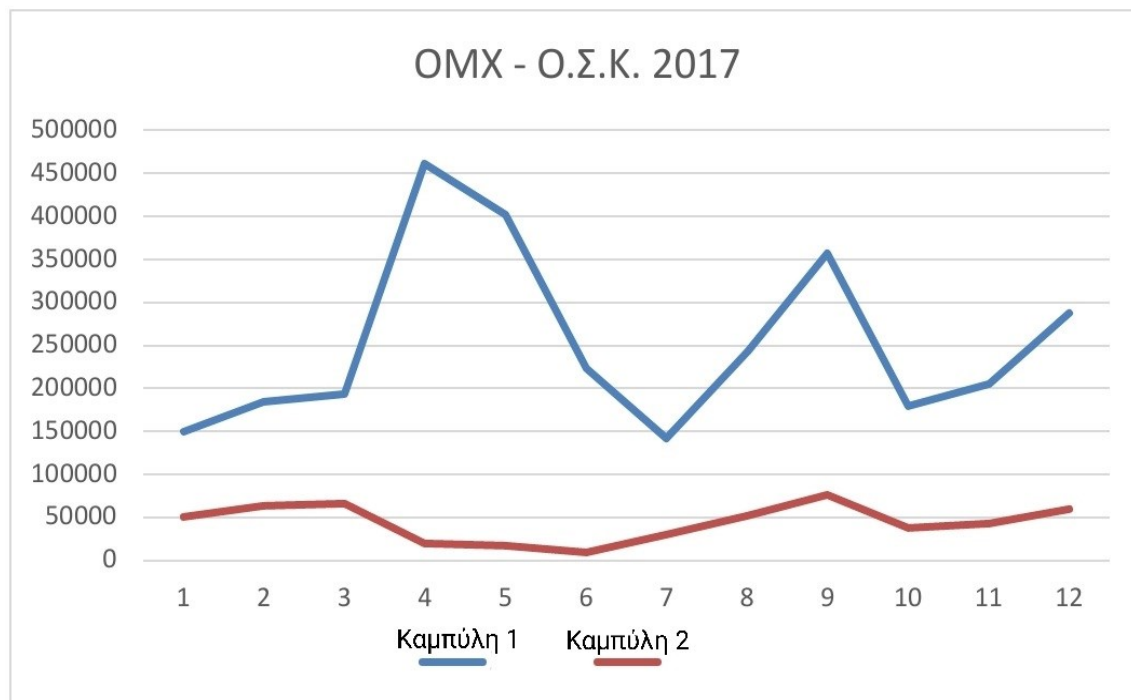


Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)

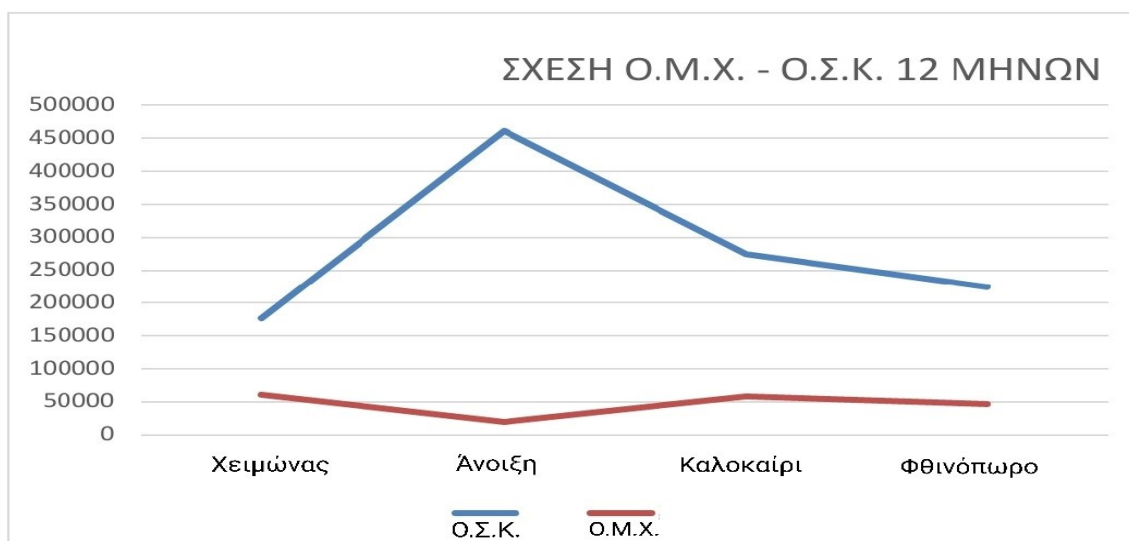
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ ΟΛΙΚΗΣ ΜΕΣΟΦΙΛΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ (Ο.Μ.Χ) – ΟΛΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (Ο.Σ.Κ.) ΑΝΑ ΜΗΝΑ.

(ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ)	Ο.Σ.Κ. (κύτταρα/mL)	Ο.Μ.Χ (cfu/mL)
12^{ος} 2016	150000	51181,5
1^{ος} 2017	184999	63133,4
2^{ος} 2017	193749,5	66115,2
3^{ος} 2017	460998	19831,7
4^{ος} 2017	402005	17248,7
5^{ος} 2017	223005	9622,7
6^{ος} 2017	142000	30204,6
7^{ος} 2017	241997	52030,3
8^{ος} 2017	356995,5	76068,1
9^{ος} 2017	179999	38173,6
10^{ος} 2017	205000	42785,6
11^{ος} 2017	286999	59799,9



Καμπύλη 1: Ολικά Σωματικά Κύτταρα (Ο.Σ.Κ.)

Καμπύλη 2: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.)



Στους πίνακες Δ49, Δ50, Δ51, Δ52, Δ53, Δ54, Δ55, Δ56, Δ57, Δ58, Δ59, Δ60, δίνονται τα αποτελέσματα βαθμονόμησης ανα μήνα.

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ49: Βαθμονόμηση Δεκεμβρίου 2016

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
12,9	143.004	48.806	2,93
13,6	147.675	50.401	2,93
14,4	153.013	52.222	2,93
15,4	159.687	54.500	2,93

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ50: Βαθμονόμηση Ιανουαρίου 2017

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
17,8	175.703	59.966	2,93
19,0	183.711	62.700	2,93
20,5	193.721	66.116	2,93

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ51: Βαθμονόμηση Φεβρουαρίου 2017

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
17,8	175.703	59.966	2,93
19,0	183.711	62.700	2,93
20,5	193.721	66.116	2,93
22,3	205.733	70.216	2,93

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ52: Βαθμονόμηση Μαρτίου 2017

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
53,4	417.282	17.909	23,3
57,1	441.974	18.969	23,3
61,3	466.000	20.000	23,3

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ53: Βαθμονόμηση Απριλίου 2017

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
47,4	378.576	16.248	23,3
50,2	395.927	16.993	23,3
53,4	417.282	17.909	23,3
57,1	441.974	18.969	23,3
61,3	466.000	20.000	23,3

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ54: Βαθμονόμηση Μαΐου 2017

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
23,2	211.739	9.087	23,3
24,2	218.412	9.374	23,3
25,3	225.753	9.689	23,3
26,5	233.761	10.033	23,3
27,9	243.104	10.434	23,3

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ55: Βαθμονόμηση Ιουνίου 2017

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
12,3	139.000	29.637	4,69
12,9	143.004	30.491	4,69
13,6	147.675	31.487	4,69
14,4	153.013	32.625	4,69

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ56: Βαθμονόμηση Ιουλίου 2017

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
25,3	225.753	48.135	4,69
26,5	233.761	49.842	4,69
27,9	243.104	51.835	4,69
28,7	248.443	52.973	4,69
29,5	253.782	54.111	4,69
30,4	259.788	55.392	4,69
31,3	265.794	56.673	4,69
32,4	273.135	58.238	4,69

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ57: Βαθμονόμηση Αυγούστου 2017

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
39,0	317.180	67.629	4,69
40,8	329.192	70.190	4,69
42,8	347.878	74.174	4,69
45,0	362.560	77.305	4,69
47,4	378.576	80.720	4,69
50,2	395.927	84.420	4,69

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ58: Βαθμονόμηση Σεπτεμβρίου 2017

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
14,4	153.013	31.811	4,81
15,4	159.687	33.199	4,81
16,8	169.030	35.141	4,81
17,8	175.703	36.529	4,81
19,0	183.711	38.194	4,81
20,5	193.721	40.275	4,81
22,3	205.733	42.772	4,81
23,2	211.739	44.020	4,81

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ59: Βαθμονόμηση Οκτωβρίου 2017

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
17,8	175.703	36.529	4,81
19,0	183.711	38.194	4,81
20,5	193.721	40.275	4,81
22,3	205.733	42.772	4,81
23,2	211.739	44.020	4,81
24,2	218.412	45.408	4,81
25,3	225.753	46.934	4,81
26,5	233.761	48.599	4,81
27,9	243.104	50.541	4,81

ΠΙΝΑΚΑΣ Δ60: Βαθμονόμηση Νοεμβρίου 2017

ΧΡΟΝΟΣ ΠΗΞΗΣ σε sec	ΤΙΜΗ Ο.Σ.Κ.	ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Ο.Μ.Χ.	ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ Ο.Σ.Κ./ Ο.Μ.Χ.
29,5	253.782	52.761	4,81
30,4	259.788	54.010	4,81
31,3	265.794	55.259	4,81
32,4	273.135	56.785	4,81
33,5	280.476	58.311	4,81
34,7	288.484	59.976	4,81
36,0	297.160	61.780	4,81
37,5	307.170	63.860	4,81
39,0	317.180	65.942	4,81
40,8	329.192	68.440	4,81

10.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα έδειξαν συσχετισμούς μεταξύ του συνολικού αριθμού των μικροβίων και του αριθμού των σωματικών κυττάρων κατά τη διάρκεια κάθε μήνα και κάθε εποχής. Οπότε προκύπτει το συμπέρασμα ότι η εποχή έχει επιρροή στον αριθμό των σωματικών κυττάρων στο γάλα και στον συνολικό αριθμό των μικροβίων. Ο αριθμός σωματικών κυττάρων ήταν ο υψηλότερος την άνοιξη (λίγο πάνω από το μέγιστο όριο) και ο χαμηλότερος το χειμώνα και στις αρχές του φθινοπώρου. Αυτό δείχνει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της μαστίτιδας κατά τη διάρκεια της καυτής περιόδου παρά σε ψυχρή περίοδο. Το kit SOMATOMIC ταυτίζεται 100% με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τις κλασικές μεθόδους, δίνοντας ακριβή αποτελέσματα μέσα σε sec. Επομένως, αποτελεί μία εναλλακτική μέθοδο του προσδιορισμού OMX και σωματικών κυττάρων.

10.4 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια στις βιομηχανίες τροφίμων και ειδικότερα στην παραγωγή γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, για βελτίωση της ποιότητας του γάλακτος και κατά συνέπεια την αποτελεσματικότερη επεξεργασία του. Η γρήγορη και έγκαιρη ανίχνευση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του νωπού γάλακτος και η σωστή αρχική επεξεργασία του, μέσω ασφαλούς παστερίωσης, είναι από τις κύριες προτεινόμενες παρεμβάσεις στη διαδικασία της αλυσίδας γάλακτος που μπορούν να προσφέρουν πολυάριθμα διατροφικά οφέλη στους καταναλωτές.

Στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής εφαρμόστηκαν δύο νέες μέθοδοι, η μία για τον έλεγχο σωστής παστερίωσης του γάλακτος με καλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης και η δεύτερη για την ταχύτερη ποσοτική μέτρηση του αριθμού των ολικών σωματικών κυττάρων (ΟΣΚ) που μειώνει το οικονομικό κόστος και τον χρόνο προσδιορισμού τους, ενώ ελαχιστοποιεί τον εργαστηριακό εξοπλισμό που απαιτείται για την απαρίθμησή τους. Η συσχέτιση μεταξύ ολικών σωματικών κυττάρων (ΟΣΚ) και ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ΟΜΧ) επαληθεύεται με αυτήν τη νέα μέθοδο.

Για τη μέθοδο παστερίωσης, εξετάστηκαν πεντακόσια (500) δείγματα παστεριωμένου γάλακτος και οκτακόσια (800) δείγματα νωπού γάλακτος από αγελάδες, κατσίκες και πρόβατα και η νέα μέθοδος συγκρίθηκε με εμπορικά κιτ παστερίωσης που ελήφθησαν από τις εταιρείες Lactognost Heyl και Sensobiz. Η νέα μέθοδος έχει αυξημένη και πιο ευαίσθητη ανίχνευση ορίου (Limit of Detection - LoD) ίση με 3,5 mU/L ALP και δίνει ακριβή αποτελέσματα μέσα σε 10 sec, τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά.

Για την ποσοτική μέτρηση των ολικών σωματικών κυττάρων (ΟΣΚ), εξετάστηκαν χίλια διακόσια (1200) δείγματα νωπού αγελαδινού γάλακτος και η νέα μέθοδος αξιολογήθηκε σε σχέση με έτοιμο εμπορικό όργανο που ελήφθη από την Lactoscan. Η νέα μέθοδος χρησιμοποίησε φασματοφωτόμετρο Electra m2 Unified Analyzer. Οι δύο συγκρινόμενες μέθοδοι έδωσαν πανομοιότυπα αποτελέσματα στα ολικά σωματικά κύτταρα (ΟΣΚ), αλλά τα οφέλη της νέας μεθόδου εστιάζονται στην εξοικονόμηση χρόνου, αφού τα αποτελέσματα λαμβάνονται σε 15 sec, στο κόστος εργασίας και στον εργαστηριακό εξοπλισμό που απαιτείται για τη διεξαγωγή της ανάλυσης.

Συμπερασματικά, οι δύο νέες μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν στις μονάδες επεξεργασίας γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, ώστε να διευκολυνθούν σημαντικά τα βήματα της βιομηχανοποιημένης αυτής διαδικασίας.

10.5 ABSTRACT

The growing world population is pushing the food industry and especially the milk and dairy sector to optimize collection processes, improve the quality of milk as a raw material and its more efficient processing. The fast and early detection of the physicochemical properties of raw milk and its correct initial processing through safe pasteurization are among the main suggested interventions on milk chain process that can provide numerous nutritional benefits to consumers.

The main objective of the present thesis was the development of two (2) novel methods, the first for the proper milk pasteurization with a higher and more sensitive limit detection and the second, for the fastest quantitative measurement of somatic cells count (SCC) which diminishes financial costs, saves time for getting results and minimizes the laboratory equipment needed for their enumeration. The correlation between SCC and total bacteria count (TBC) was verified with this novel method.

For the pasteurization method, five hundred (500) samples of pasteurized milk and eight hundred (800) samples of raw milk obtained from cows, goats and sheep were tested and the novel method was evaluated against ready commercial pasteurization kits obtained from Lactognost Heyl and Sensobiz. The novel method had a lower and more sensitive limit of detection (LoD) equal to 3.5 mU/L ALP and gave accurate results within 10 seconds, both quantitatively and qualitatively.

For the quantitative measurement of SCC, one thousand two hundred (1200) samples of raw cow milk were tested and the novel method was evaluated against a ready-made commercial instrument obtained from Lactoscan. The novel method used a spectrophotometer Electra m2 Unified Analyzer and the two comparable methods had identical results for SCC but the benefits of the novel method are focused on time efficiency as the results are obtained in 15 seconds, on labor costs and on the laboratory equipment required to perform the analysis.

In conclusion, the two novel methods can be applied to milk and dairy processing plants, to greatly facilitate the steps of this industrialized process.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alais C, and Blanc B. (1975). Milk proteins: biochemical and biological aspects. *In* World Rev. Nutr. Diet. **20**:66. G. H. Bourne, Ed. S. Karger., Basel, Switzerland.
2. Anifantakis E. M., and Rosakis P. S. (1983). Alkaline phosphatase activity of sheep milk and some factors affecting it. *Egyptian Journal of Dairy Science* **11**, 173–182.
3. Aschaffenburg R. and J. E. C. Mullen (1949). A rapid and simple phosphatase test for milk. *Journal of Dairy Research*, **16**, 58–67.
4. Barbosa M. (2005). Interest in controlling alkaline phosphatase activity in sheep and goat milks. Pages 117–127 in Proc. International Symposium, Zaragoza, Spain. Special issue. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
5. Bergonier D., Berthelot X., (2003). New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science*. **79**, 1-16.
6. Berthelot X., Lagriffoul G., Concordet D., Barillet F., Bergonier D., (2006). Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. *Small Ruminant Research* **62**, 27-31.
7. Beutin L, Martin A. (2012) Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *Journal of Food Protection* Feb;**75**(2):408-18. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-452. PMID: 22289607.
8. Bonnet M., Lagier J. C., Raoult D., Khelaifia S., (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections* **34**, 100622. doi:10.1016/j.nmni.2019.100622.
9. Bortolato M., Besson F., Roux B., (2002). An Infrared Study of the Thermal and pH Stabilities of the GPI-Alkaline Phosphatase from Bovine Intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol. **292**, Issue 4.
10. Bridsen E. (1994) The Development, manufacture and control of microbiological culture media. Published by Oxoid, Basingstoke UK
11. Bridson E. (1998): The Oxoid Manual, 8th Edition, Basingstoke: Oxoid
12. Brock T. D. (1998). History of the agar plate. *Asm Press*, p101 4.
13. Brown J. H. (1919) The use of blood agar for the study of streptococci. Rockefeller Institute for Medical Research Monograph No.9. The Rockefeller Institute for Medical Research, New York.

14. Bruce J. (2001). Room for improvement. Dairy Industry Introduction, **66**, 28-29.
15. Burgwald L. H. (1939). The phosphatase test. A review of the literature on its application for detecting irregularities in the pasteurization of milk and dairy products. Journal of Dairy Science, **22**, 853–872.
16. Cancino-Padilla N., Fellenberg M. A., Franco W., Ibáñez R. A., Vargas-Bello-Pérez E., (2017). Foodborne bacteria in dairy products: Detection by molecular techniques **44**, 215–229.. doi:10.7764/rcia.v44i3.1811
17. Cézard F. Biotechnologies en 27 fiches. 2nd édition. Paris: Dunod; (2013).
18. Chilliard Y., Ferlay A., Rouel J., Lamberet G. (2003) A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. Journal of Dairy Science, **86**, 1751-1770.
19. Claeys W. L., van Loey A. M., Hendrickz M. E., (2002). Kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase inactivation and of β - lactoglobulin denaturation in milk with different fat content. Journal of Dairy Research, **69**, 541-553.
20. Claeys W. L., Verraes C., Cardoen S., De Block J., Huyghebaert A., Raes K., Dewettinck K., Herman L., (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. Food Control **42**, 188–201. doi:10.1016/j.foodcont.2014.01.045.
21. Clark N. C., Weigel L. M., Patel J. B. and Tenover F. C. (2005). "Comparison of Tn1546-Like Elements in Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Michigan and Pennsylvania", Antimicrob Agents Chemother. Vol. **49**, No. 1: 470–472.
22. Collins, C. H. (1967): Microbiological Methods, London: Butterworths.
23. Collins C. H, Lyne P. M. (1970) Microbiological methods. 3rd ed. London: Arnold;.
24. Compton and Mcdougall (2008). Heifer mastitis- A review of recent studies.
25. Corry J. E., Curtis G. D. W. and Baird R. M. (Eds.). (1996). Culture media for food microbiology. Elsevier.
26. Coutea D., McCartney A. L., Gibson G. R., Williamson G., Faulds C. B. (2001). "Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid", Journal of Applied Microbiology, Vol. **90**, Issue 6, pp873–881.
27. Cuccuru C., Meloni M., Sala E., Scaccabarozzi L., Locatelli C., Moroni, P., Bronzo V., 2011. Effects of intramammary infections on somatic cell score and milk yield in Sarda sheep. New Zealand Veterinary Journal **59**, 128-131.

28. Darzins E. (1958). *The Bacteriology of Tuberculosis*, University of Minnesota: Minnesota, USA
29. Denyer S. P., Hodhes N. A. and Gorman S. P. (2004): *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*, 7th Edition, London: Blackwell Publishing, pp14-15.
30. Dione N., Khelaifia S., La Scola B., Lagier J. C., and Raoult D. (2016). A quasi-universal medium to break the aerobic/anaerobic bacterial culture dichotomy in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection*, **22**(1), 53-58.
31. dos Anjos F., Machad A., Ferro C., Otto F., and Bogin E. (1998). Gamma-glutamyltransferase as a marker for the pasteurization of milk. *Journal Food Protection* **61**, 1057–1059.
32. Duncan S. H., Hold G. L., Harmsen H. J., Stewart C. S., and Flint H. J. (2002). Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **52**(6), 2141-2146.
33. Eckner K. F. (1992). Fluorometric analysis of alkaline phosphatase in-activation correlated to *Salmonella* and *Listeria* inactivation. *Journal of Food Protection* **55**, 960–963.
34. EFSA, (2015). “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013.” *EFSA Journal* 2015;13(1):3991.
35. EFSA, (2015b). Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal* 2015;13(1):3940.
36. Ehrlich P. (1885) *Das Sauerstoff-Bedurniss des Organismus, eine farbanalytische Studie*. Hirschwald, Berlin.
37. Entis P. (2002). *Food microbiology: the laboratory*. Phyllis Entis.
38. FAOSTAT (2015). <http://faostat.fao.org/default.aspx>.
39. FAO/WHO (1970) Joint FAO/WHO expert committee on milk hygiene. Third report. Technical series No **83/453**. Rome.
40. Fischbach F. T., and Dunning M. B. (2009). *A manual of laboratory and diagnostic tests*. Lippincott Williams and Wilkins.
41. Fotou K., Tzora A., Voidarou C., Alexopoulos A., Plessas S., Avgeris I., Bezirtzoglou E., Akrida-Demertzi K., Demertzis P. G., (2011). Isolation of

- microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. *Anaerobe* **17**, 315–319.. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.05.002.
42. Fox P.F. and Kelly A. L., (2006) "Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2", *International Dairy Journal* **16**, 2006: 517-532.
 43. Fthenakis G. C., El-Masannat E. T. S., Booth J. M., Jones J. E. T., (1991). Somatic cell counts of ewes' milk. *British Veterinary Journal* **147**, 575-581.
 44. Fthenakis G. C., (1994). Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of Southern Greece. *Small Ruminant Research* **13**, 293-300.
 45. Fthenakis G. C., (1995). California Mastitis Test and Whiteside Test in diagnosis of subclinical mastitis of dairy ewes. *Small Ruminant Research* **16**, 271-276.
 46. Egger-Danner C., Cole J. B., Pryce J. E., Gengler N., Heringstad B., Bradley A., Stock K. F., (2015). Invited review: overview of new traits and phenotyping strategies in dairy cattle with a focus on functional traits. *Animal* **9**, 191–207.. doi:10.1017/s1751731114002614.
 47. Gallusser A., and Bergner K. G. (1981). Reactivation of alkaline phosphatase in UHT milk, depending on its oxygen content. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*. **77**, 441–444.
 48. Gao A., Mutharia L., Chen S., Rahn K., Odumeru J., (2002). Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in Milk. *Journal of Dairy Science*, **85**, 3198–3205.. doi:10.3168/jds.s0022-0302(02)74408-1.
 49. Gonzalo C., Ariznabarreta A., Carriedo J.A., San Primitivo F., (2002). Mammary pathogens with somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, **85**, 1460-1467.
 50. Gonzalo C., Tardaguila J. A., De La Fuente L. F., San Primitivo F., (2004). Effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. *Journal of Dairy Research*, **71**, 33-38.
 51. Gonzalo C., Carriedo J. A., Beneitez E., Juarez M. T., De La Fuente L. F., San Primitivo F. (2006) Short communication: Bulk tank total bacterial count in dairy sheep: Factors of variation and relationship with somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, **89**, 549-552.
 52. Haab W. and Smith L. M. (1956). Variations in alkaline phosphatase activity of milk. *Journal of Dairy Science* **39**, 1644–1650.

53. Haenlein G. F. (2001) Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of Dairy Science*, **84**(9), 2097-115.
54. Haenlein G. F. W. (2002). Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. *Small Ruminant Research* **45**, 163–178. doi:10.1016/s0921-4488(02)00097-4.
55. Harding F. (1991). Alkaline phosphatase test as a measure of correct pasteurization. Bulletin 262. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
56. Harding F. and Garry E. (2005). Collaborative evaluation of a fluo-rometric method for measuring alkaline phosphatase activity in cow's, sheep's and goat's milk. *Journal of Food Protection* **68**, 1047–1053.
57. Hitchens A. P. and Leikind M. C. (1939). "The introduction of agar-agar into bacteriology". *Journal of Bacteriology* Vol. **37**, 485–493.
58. Hooijdonk van T. and Hettinga K. (2015). Dairy in a sustainable diet – a question of balance. *Suppl 1*, 48-54, doi:10.1093/nutrit/nuv040.
59. Hueston W. D., Hartwig N. R., Judy J. K. (1986). Patterns of nonclinical intramammary infection in a ewe flock. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. vol **188**, 170-172.
60. IDF, International Dairy Federation, (1995). Enumeration of somatic cells. IDF Standard 757 No. 148A. Brussels, Belgium, 8 p.
61. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, (1980).
62. Jayarao B. M. and Wolfgang D. R. (2003). Bulk-tank milk analysis. A useful tool for improving milk quality and herd udder health. **19** (1), 75-92. Doi: 10.1016/s0749-0720(02)00075-0.
63. Jayarao B. M., Wolfgang D. R. (2003) Bulk-tank milk analysis. A useful tool for improving milk quality and herd udder health. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* **19**(1), 75-92, vi. doi: 10.1016/s0749-0720(02)00075-0. PMID: 12682936.
64. Kantrowitz E. R. *E. coli* (2011) Alkaline Phosphatase. in *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* (John Wiley and Sons, Ltd. doi:10.1002/9781119951438.eibc0479
65. Katsaounis N. and Zygoiannis D. (1986a) Resultats de Γ utilization en Grece de la race Berrichon du cher dans croisements du type industriel avec des races indigenes. *Ree. Med. Vet.* 1986a, **162**, 587-592.
66. Katsaounis N. and Zygoiannis D. (1986b). The East Friesland sheep in Greece. *Research and Development in Agriculture*, **3**, 19-30.

67. Kay H. D., Graham W. R., (1935) "The phosphatase test for pasteurized milk", Journal of dairy research, **6**, 191-203
68. Keba A., Rolon M.L., Tamene A., Dessie K., Vipham J., Kovac J., Zewdu A., (2020). Review of the prevalence of foodborne pathogens in milk and dairy products in Ethiopia. International Dairy Journal **109**, 104762. doi:10.1016/j.idairyj.2020.104762.
69. Kehrl M , Shuster D, (1994) Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland, Journal of Dairy Science Vol. **77**, No, 2.
70. Kline K., Flores S., Joyce F. (2018). Factors affecting Somatic Cell Count in milk of dairy cows in Costa Rica. International Journal of Veterinary Science and Research **4**, 001–008.. doi:10.17352/ijvsr.000027.
71. Klotz V., Hill A., Warriner K., Griffiths M., and Odumeru J. (2008). Assessment of the colorimetric and fluorometric assays for alkaline phosphatase activity in cow's, goat's, and sheep's milk. Journal of Food Protection **71**, 1884–1888.
72. Knaysi G., Werkman C. H. and Wilson P. W. (1951). Bacterial physiology. New York: Acad. Press Inc.
73. Knight A. H., and Fryer S. M. (1989). The development of heat-re-sistant phosphatase activity in raw milk. Journal of the Society of Dairy Technology **42**, 81–86.
74. Koch R. (1876) Untersuchungen ueber Bakterien V. Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begruendent auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus Anthracis*. Beitr. z. Biol. D. Pflanzen **2**, 277-310. In Milestones in Microbiology: 1556 to 1940, translated and edited by Thomas D. Brock, ASM Press. (1998), p89
75. Koch R. (1881) Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. Mitth. a. d. Kaiserl. Gesundheitsampte 1: 1-48. Cited in Milestones in Microbiology: 1556 to 1940, translated and edited by Thomas D. Brock, ASM Press. 1998, p101.
76. Kosikowski F. V. (1988). Enzyme behavior and utilization in dairy technology. Journal of Dairy Science **71**, 557–573.
77. Krebs H. A. (1937). "The role of fumarate in the respiration of *Bacterium coli commune*", Biochemical Journal Vol.**31**, No. 11, 2095–2124.
78. Kuang D. M., Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang J. P., Wu C, Zheng L. (2009) Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. J. Exp. Med. **206**, 1327–1337.

79. Kumar P, Sud R. K. and Gupta K. G. (1973) Interference of some pesticides in the milk phosphatase pasteurization test. *Journal of Dairy Science* **56**, 553-557.
80. Kumar S. (2012). *Textbook of microbiology*. JP Medical Ltd.
81. Kuzuya Y., Kanamaru Y., and Tanahashi T. (1982). Purification of bovine milk alkaline phosphatase with affinity chromatography and effect of flavonoids and saccharides on the enzyme activities. *Nippon Chikusan Gakkaiho* **53**, 45–49.
82. Lagier J. C., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C. and Raoult D. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection*, **18**(12), 1185-1193.
83. Lagier J. C, Hugon P, Khelaifia S, Fournier P. E, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical Microbiology Reviews* (2015), **28**, 237–64.
84. Lagier J. C., Edouard S., Pagnier I., Mediannikov O., Drancourt M. and Raoult D. (2015). Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, **28**(1), 208-236.
85. Lakra S., Jadhav V. J., Garg S. R. (2016). "Development of a Chromatographic Method for the Determination of Alkaline Phosphatase Activity in Pasteurized Milk", *Food Analytical Methods*, **9**, 2002-2009.
86. Lambert L. M. (1970) *Modern dairy products*. Chemical Publish. Co. New york.
87. La Scola B., Khelaifia S., Lagier J. C., and Raoult D. (2014). Aerobic culture of anaerobic bacteria using antioxidants: a preliminary report. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, **33**(10), 1781-1783.
88. Lauer B. A., Reller L. B. and Mirrett S. (1981). Comparison of acridine orange and Gram stains for detection of microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **14**, 201-205.
89. Lech K., and Brent R. (2000). Techniques for bacterial cell culture: media preparation and bacteriological tools. *Current protocols in cytometry*, **11**(1), A-3E.
90. Lehner A., Nitzsche S., Breeuwer P., Diep B., Thelen K. and Stephan R. (2005). "Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection", *BMC Microbiology*, Vol. **6**, No.15, pp1-8
91. Leitner G., Chaffer M., Zamir S., Mor T., Glickman A., Winkler M. and Weisblit L., Saran A., (2001). Udder disease etiology, milk somatic cell counts and NAGase activity in Israeli Assaf sheep throughout lactation. *Small Ruminant Research*, **39**, 107-112.

92. Leveux D., N. Geneix and Leveux A. (2007). Inactivation-denatur-ation kinetics of bovine milk alkaline phosphatase during mild heating as determined by using a monoclonal antibody-based im-munoassay. *Journal of Dairy Research* **74**, 296–301.
93. Levine M. and Schoenlein H. W. (1930). *A Compilation of culture media*. Williams and Williams: Baltimore USA
94. Linden G. (1979). Biochemical study of some aspects of milk alkaline phosphatase reactivation. *Milchwissenschaft* **34**, 329–332.
95. Loeffler F. (1884) Mittheil Kaiserl Gesundheitsante 2. cited in Brock, T. (1998) Robert Koch: a life in medicine and bacteriology. Science Technical Publications. Madison, WI, USA
96. Lucey J. A., (2015). Raw Milk Consumption. *Nutrition Today* **50**, 189–193.. doi:10.1097/nt.0000000000000108.
97. Luengo C., Sanchez A., Corrales J., Fernandez C. and Contreras A., (2004). Influence of intramammary infection and non-infection factors on somatic cell counts in dairy goats. *Journal of Dairy Research*, **71**(2), 169-174. doi: 10.1017/S0022029904000019.
98. Lyster R. L. J., and Aschaffenburg A. (1962). The reactivation of milk alkaline phosphatase after heat treatment. *Journal of Dairy Research*. **29**, 21–35.
99. Ma Y., Barbano D. M., Hotchkiss J. H., Murphy S. and Lynch J. M. (2001). Impact of CO₂ addition to milk on selected analytical testing methods. *Journal of Dairy Science* **84**, 1959-1968.
100. MacConkey A. (1905) Lactose-fermenting bacteria in faeces. *Journal of Hygiene*, **8**, 333-379.
101. Madison B. M. (2001) Εφαρμογή λεκέδων στην κλινική μικροβιολογία, Βιοτεχνική και Ιστοχημεία, **76**:3,119-125, DOI: [10.1080/bih.76.3.119.125](https://doi.org/10.1080/bih.76.3.119.125)
102. Manafi M. (2000). "New developments in chromogenic and fluorogenic culture media", *International Journal of Food Microbiology*, Vol. **60**, Issues 2-3, pp205-218.
103. Manolkidis K. S. and Alichanidis E. S. 1971 Effects of some antibiotics on the milk phosphatase pasteurization test. *Journal of Dairy Science* **54**, 335-338.
104. Martin D., Kiesner C., Lorenzen P. C. and Schlimme E. (1998). Ad-enosine deaminase (EC 3.5.4.4.) A potential indicator of heat treatment for the distinction of short-time and high-temperature pasteurized milk from the market. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **50**, 225–233.

105. Massa S., Caruso M., Trovatelli F. and Tosques M. (1998): "Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. **14**, pp727-730.
106. Mathur M. P. (1974). Studies on alkaline phosphatase in goat milk. *Indian Journal of Dairy Science* **28**, 145–147
107. Mavrogenis A. P., Koumas A., Kakoyiannis C. K., Taliotis C. H., (1995). Use of somatic cell counts for the detection of subclinical mastitis in sheep. *Small Ruminant Research* **17**, 79-84.
108. Mavrogenis A. P, Koumas A. and Gabriilidis G. (1999). The inheritance of somatic cell counts (index of mastitis) in Chios sheep. *Eaap publications* **95**, 389-392
109. McDade J. E., Sheperd C. C., Fraser D. W., Tsai T. R., Redus M. A., Dowdle W. R. and Laboratory Investigation Team (1977) "Legionaire's disease: Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease", *New England Journal of Medicine*, **297**, 1197-1203.
110. McDougall S., Murdough P., Pankey W., Delane C., Barlow J., Scruton D. (2001). Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **40** (3), 245-254.
111. McDougall S. (2002) Bovine mastitis: epidemiology, treatment and control, *New Zealand Veterinary Journal*, 50:sup3, 81-84.
DOI: [10.1080/00480169.2002.36274](https://doi.org/10.1080/00480169.2002.36274).
112. McDougall S., Voermans M., (2002). Influence of estrus on somatic cell count in dairy goats. *Journal of Dairy Science* **85**, 378-383.
113. McIntosh J. (1946). " Emergency Pathology Service", *Lancet*, 6401, p669.
114. McKellar R. C., Modler H. W., Couture H., Hughes A, Mayers P., Gleeson T. and Ross W. H. (1994). Predictive modeling of alkaline-phosphatase inactivation in a high-temperature short-time pas-teurizer. *Journal of Food Protection* **57**, 424–430.
115. Mcnees A. L., Markesich D., Zayyani N. R., Graham D. Y., (2015). *Mycobacterium paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* **9**, 1523–1534. doi:10.1586/17474124.2015.1093931.
116. Menzies F. D., McBride S. H., McDowell S. W., McCoy M.A., McConnell W., Bell C. (2000 Jul 29). Clinical and laboratory findings in cases of toxic mastitis in cows in Northern Ireland. *Veterinary Record* **147**(5),123-8. doi: 10.1136/vr.147.5.123. PMID: 10958533.

117. Menzies P. I., Ramanan S. Z., (2001). Mastitis of sheep and goats, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* **17**, pp 333–358.
118. Merck E. (1983): Bericht uber das Jahr 1982, p84 cited in Metz H. (1990): *Culture Media: Then and Now, The Medical Technology*, March 1990, pp14-15.
119. Mielke A. and Roubicek T. (2003). "A Rate-Independent model for inelastic behavior of shape-memory alloys". *Multiscale Modeling and Simulation* **1** (4), 571–597.
120. Miggianno G. A., Mordente A., Martorana G. E., Meucci E., and Castelli A. (1983). In vitro effect of ascorbic acid on bovine kidney alkaline phosphatase activity. *Acta Vitaminologica et Enzymologica* **5**, 153–158.
121. Moatsou G. (2010). Indigenous enzymatic activities in ovine and caprine milks. *International Journal of Dairy Technology* **63**, 16–31.
122. Modi S., Brahmhatt M. N., Chatur Y. A., Nayak J. B., (2015). Prevalence of *Campylobacter* species in milk and milk products, their virulence gene profile and antibiogram. *Veterinary World* **8**, 1–8.. doi:10.14202/vetworld.2015.1-8.
123. Montville T. J., Matthews K. R., Kniel K. E. (2012). *Food Microbiology. An Introduction*, Third Edition. ASM Press.
124. Morand-Fehr P., Fedele V., Decandia M., Le Frileux Y. (2007) Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, **68**, 20-34.
125. Mortimer P. (2001). "Koch's colonies and the culinary contribution of Fanny Hesse", *Microbiology Today*, Vol. **28**, pp136-137..
126. Mowlem A. (1988) Goat milking. In: *Goat farming* (2nd edn). Farming Press Books, United Kingdom, pp. 109-127.
127. Muir D. D., (1996). The shelf-life of dairy products: 3. Factors influencing intermediate and long life dairy products. *International Journal of Dairy Technology* **49**, 67–72. doi:10.1111/j.1471-0307.1996.tb02493.x
128. Muehlherr J. E., Zweifel C., Corti S., Blanco J. E. and Stephan T. R. (2003). Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *Journal of Dairy Science*, **86**, 3849-3856.
129. Muller L. (1923) Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacilli typique et des papythiques. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie Filiales*. **89**, 433-437.

- 130.** Murthy G. K., Cox S. and Kalyor L. (1976). Reactivation of alkaline phosphatase an ultra high-temperature, short-time processed liquid milk products. *Journal of Dairy Science* **59**, 1699-1710.
- 131.** Murthy G. K., Martin R., Rhea U. S. and Peeler J. T. (1979). Rapid colorimetric test for alkaline phosphatase in dairy food products. *Journal of Food Protection* **42**, 794-799.
- 132.** Murthy G. K. and Kaylor L. O. (1990). Evaluation of APHA and AOAC II methods for phosphatase in butter and differentiation of milk and microbial phosphatase by agarose-gel electrophoresis. *Journal Association of Official Analytical Chemists* **73**, 681–687.
- 133.** Murthy G. K., Kleyn D. H., Richardson T., and Rocco R. M., (1992). Alkaline phosphatase methods. Pages 413–431 in *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. R. T. Marshall, ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- 134.** Murphy S. C. and Boor K. J. (2000). Source and causes of high bacteria counts in raw milk an abbreviated review. *Dairy, Food, and Environmental Sanitation*, **20**, 606–611.
- 135.** Nudda A., Battacone G., Bencini R., Pulina G., (2004a). Nutrition and milk quality. In: Pulina, G. (Ed.), *Dairy Sheep Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK, pp. 129–149.
- 136.** Olechnowicz J. and Jaśkowski, J. M. (2004). Komórki somatyczne mŁeka koziego [Somatic cells in goat milk]. *Medycyna Weterynaryjna*, Vol. **60**, No. 12, pp.1263-1266, ISSN 0025-8628.
- 137.** Oliver S. P., Jayarao B. M., Almeida R. A., (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food Safety and Public Health Implications. *Foodborne Pathogens and Disease* **2**, 115–129.. doi:10.1089/fpd.2005.2.115.
- 138.** Oliver S. P., Boor K. J., Murphy S. C, Murinda S. E. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 pp. 793-806. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2009.0302>
- 139.** Paape M. J., Wiggans G. R., Bannerman D. D., Thomas D. L., Sanders A. H., Contreras A., Moroni P., Miller R. H., (2007). Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Ruminant Research* **68**, 114-125.

140. Painter C. J. and Bradley R. L., Jr* (1997). Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time-temperature treatments. *Journal of Food Protection* **60**, 525–530.
141. Park J. and Kim Y., (2013) "An improved fluorogenic substrate for the detection of alkaline phosphatase activity", *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **23**, 2332-2335
142. Pasupuleti V. K. and Demain A. L. (2010). *Protein Hydrolysates in Biotechnology*, Springer: London.
143. Paswan R., Park Y. W., (2020). Survivability of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 pathogens and food safety concerns on commercial powder milk products. *Dairy* **1**, 189–201. doi:10.3390/dairy1030014.
144. Pengov A. (2001). The role of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*. Mar; **84**(3), 572-4.
doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74509-2. PMID: 11286408.
145. Perrin G. G., Mallereau M. P., Lenfant D., Baudry C., (1997). Relationships between California mastitis test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. *Small Ruminant Research* **26**, 167–170.. doi:10.1016/s0921-4488(96)00990-x.
146. Picart L., Thiebaud M., Rene M., Guiraud J. P., Cheftel J. C. and Dumay E. (2006). Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*. **73**, 454–463.
147. Pirisi A., Lauret A., Dubeuf J. P., (2007). Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Ruminant Research* **68**, 167- 178.
148. Popescu A., Doyle R. J. (1996) The Gram stain after more than a century. *Biotechnic and Histochemistry*. **71**, 145-151.
149. Popovic-Vranjes A., Popovic M., Jevtic M., (2015). Raw milk consumption and health. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* **143**, 87–92. doi:10.2298/sarh1502087p.
150. Power D. A. and Johnson J. A. (2009). *Difco™ and BBL™ manual. Manual of Microbiological Culture Media*, **359-60**.
151. Prescott L. M., Willey J. M., Sherwood L. M., Woolverton C. J. (2018). *Microbiologie*. 5eme edition. Louvain-la-Neuve:De Boeck Superieur.
152. Putignani L, Menichella D. (2010). Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen cryptosporidium. *Interdiscip Perspect Infect Dis*.

2010;2010:753512. doi: 10.1155/2010/753512. Epub 2010 Jul 14. PMID: 20706669; PMCID: PMC2913630.

153. Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford T. P., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Cotter P. D. (September 2013). The complex microbiota of raw milk, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume **37**, Issue 5, Pages 664–698,

<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.

154. Rademacher B. and Hinrichs J. (2006). Effects of high pressure treatment on indigenous enzymes in bovine milk: Reaction kinetics, inactivation and potential application, *International Dairy of Journal* **16**, 655-661.

155. Radovanovic R. (2011). Food safety: the global problem as a challenge for future initiatives and activities. *Advances in Food Protection: Springer*; p. 27-48.

156. Rankin S. A., Christiansen A., Lee W., Banavara D. S., Lopez-Hernandez A. (2010). "Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization", *Journal of Dairy Science*, **93**, 5538-5551.

157. Rankin S. A., Bradley R. L., Miller G., Mildenhall K. B., (2017). A 100-Year Review: A century of dairy processing advancements—Pasteurization, cleaning and sanitation, and sanitary equipment design. *Journal of Dairy Science* **100**, 9903–9915. doi:10.3168/jds.2017-13187.

158. Rainard P. and Riollet C. (2003). Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reproduction Nutrition Development* **43** (5), 439-57. doi: 10.1051/rnd:2003031.

159. Raynal-Ljutovaca K., Park Y. W., Gaucheron F., and Bouhallab S. (2007). Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. **68**, 207–220.

160. Raynal-Ljutovac K., Park Y. W., Gaucheron F., Bouhallab S., (2007). Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research* **68**, 207–220.. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.006.

161. Richardson L. A., McFarren E. F., and Campbell J. E. (1964). Dy-namic state of milk: Phosphatase reactivation. *Journal of Dairy Science* **47**, 205–210.

162. Robertson G. R. (1930). " The Agar Industry in California", *Industrial and Engineering Chemistry*, Vol. **22**, Issue 10, pp 1074–1077.

163. Rocco R. M. (1990). Fluorometric determination of alkaline phosphatase in fluid dairy products. Collaborative study, *Journal Association of Official Analytical Chemists* **73**, 842-849.

164. Rosenthal I., Bernstein S. and Rosen B. (1996). Alkaline phosphatase activity in *Penicillium roqueforti* and in blue-veined cheeses. *Journal of Dairy Science* **79**, 16–19.
165. Rosso L., Lobry J. R., Bajard S., and Flandrois J. P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(2), 610-616.
166. Rowe M, Grant I., Ball H. and Pope C. (2000). An investigation of the thermal death kinetics of *Mycobacterium paratuberculosis* during pasteurization. *BSAP Occasional Publications*, **25**, 71-76. doi:10.1017/S1463981500040656.
167. Sakula A. (1982): "Baroness Burdett-Coutts' Garden Party: The International; Medical Congress, London, 1881", *Medical History*, Vol.26, pp183-190.
168. Sandle T. (2004) Gram's Stain: History and explanation of the fundamental technique of determinative bacteriology, *IST Science and Technology Journal*, No. **54**,pp3-4.
169. Sandle T. (2011): "Selection of Microbiological culture media and testing regimes" in Saghee M. R., Sandle T. and Tidswell E. C. (Eds.) (2011): *Microbiology and Sterility Assurance in Pharmaceuticals and Medical Devices*, New Delhi : Business Horizons, pp101-120.
170. Sandle T. (2020). Assessing Gram-stain error rates within the pharmaceutical microbiology laboratory. *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*.
Doi: 10.37521/ejpps/25102.
171. Sanders G. P. and Sager O. S. (1946). Modification of the phosphatase tests using different buffers, precipitants and periods of incubation. *Journal of Dairy Science* **29**, 737.
172. Sanders G. P. and Sager O. S. (1948). Heat inactivation milk phosphatase in dairy products. *Journal of Dairy Science* **31**, 845–857.
173. Sanders G. P., Sager O. S. and Hupfer J. A. (1954). Factors affecting the sensitivity and accuracy of phosphatase test. *Journal of Dairy Science* Vol. **37**, 698-710.
174. Sandholm M., Honkanen-Buzalski T., Kaatinen L., Pyorala S. (1995) Microbiology of normal milk. In: *The Bovine Udder and Mastitis*, University of Helsinki, Finland, pp. 258.
175. Schalm O. W., Carrol E. J., Jam N. C. (1971). *Bovine mastitis physical and chemical tests for detection of mastitis*. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 128-157.

176. Schlimme E., Kiesner C, Lorenzen P. C., and Martin D. (1997). Influence of heat treatment of milk on the activities of the indigenous milk enzymes alkaline phosphatase and adenosine deaminase. *Bulletin of the International Dairy Federation*. **332**, 25–31.
177. Schroeter J. Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente. In: F. Cohn: *Beiträge zur Biologie der Pflanzen I. Heft 2*. Kern's Verlag Breslau, pp. 109-126 (1872).
178. Scintu M. F., Daga E. and Ledda A. (2000). Evaluation of spectrophotometric and fluorometric methods for alkaline phosphatase activity determination in ewe's milk. *Journal of Food Protection* **63**, 1258–1261.
179. Sinapis E., (2007). The effect of machine or hand milking on milk production, composition and SCC in mountainous Greek breed (Boutsiko) ewes. *Small Ruminant Research* **69**, 242–246.. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.02.006.
180. Shakeel-Ur-Rehman, Farkye N. Y., (2011). Enzymes Indigenous to Milk | Phosphatases, Editor(s): John W. Fuquay, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition), Academic Press, 2011, Pages 314-318, ISBN 9780123744074, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00159-X>.
181. Shamsi K., Versteeg C., Sherkat F. and Wan J. (2008). Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **9**, 217–223.
182. Sharma R. S. and Ganguli N. C. (1974). Purification and properties of reactivated alkaline phosphatase from buffalo milk. *Milchwissenschaft*. **29**, 79–84.
183. Sharma M., Manoharlal R., Shukla S., Puri N., Prasad T., Ambudkar S.V. and Prasad R. (2009). Curcumin modulates efflux mediated by yeast ABC multidrug transporters and is synergistic with antifungals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**(8), 3256-65.
184. Shitandi A, Kihumbu G. (2004). Assessment of the California mastitis test usage in smallholder dairy herds and risk of violative antimicrobial residues. *Journal of Veterinary Science* **5**(1), 5-9. PMID: 15028880.
185. Skoufos J., Voidarou C., Bezirtzoglou E. and Tzora A. (2006) Effects of machine – milking on the bacterial flora of teat duct and mammary gland of ewes. *Journal of Veterinary Medicine. B* **53**, 1-3.
186. Snell E. E. and Mitchell H. K. (1941). Purine and pyrimidine as growth substances for lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **27**(1), 1.

187. Sordillo L.M. (2005). Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science*, **98** (1-2), 67-78.
188. Stefanakis A., Boscós C., Alexopoulos C., Samartzi F., (1995). Frequency of subclinical mastitis and observations on somatic cell counts in ewes' milk in northern Greece. *Animal Science* **61**, 69-76.
189. Sung N., Collins M. T., (1998). Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 999–1005.. doi:10.1128/aem.64.3.999-1005.1998.
190. Suzuki U., Yoshimura K., Takaishi M. (1907). Über ein enzyme “phytase” das anhydro-oxy-methylen-diphosphorsäure spaltet. *Bulletin College of Agriculture. Tokyo Imperial University* **7**, 503-512.
191. Tesfaye B. Review on California Mastitis Test (CMT). *Veterinary Science Research* (2018), **3**(3), 000160.
192. Thayer J. D., Martin J. E. Jr. (1964) A selective medium for the cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*., *Public Health Report*, **79**, 49-57.
193. Tolle A., "The Microflora of the Udder (1980). In: Factors influencing the bacteriological quality of raw milk," In *International Dairy Federation Bulletin*, Document 120, 4 p.
194. Tseng C. K. (1946): *Colloid Chemistry*, Vol.6., in Alexander, J. (Ed.) *Colloid Chemistry*, New York: Reinhold Publishing Corp., p629.
195. USDA, 1953. https://naldc.nal.usda.gov/catalog.html?f%5Bcollection_facet%5D%5B%5D=USDA+publications&f%5Bpublication_year_rev%5D%5B%5D=8047-1953&q=&sort=relevance.
196. Uyttendaele M, Franz E, Schlüter O. (2016). Food safety, a global challenge *International Journal of Environmental Research Public Health*. **13**(1):67. <https://doi.org/10.3390/ijerph13010067>.
197. Vamvakaki A. N., Zoidou E, Moatsou G, Bokari M, and Anifatakis E. (2006). Residual alkaline phosphatase activity after heat treatment of ovine and caprine milk. *Small Ruminant Research*. **65**, 237–241.
198. Van Bever A. K. (1943). The influence of temperature and pasteurizing time upon the enzymes and bacteria in milk. *Enzymologia* **11**, 7–18.
199. Vega-Warner A. V., Gandhi H., Smith D. M. and Ustunol Z. (2000). Polyclonal-antibody-based ELISA to detect milk alkaline phosphatase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**, 2087–2091.

200. Vermont Dairymen's Association. (1910). Fortieth Annual Report of the Vermont Dairymen's Association. Montpelier.
201. Vermont Dairymen's Association. (1911). Forty-First Annual Report of the Vermont Dairymen's Association. Montpelier.
202. Wainwright M. and Lederberg J. (1992). History of Microbiology. Encyclopedia of Microbiology Vol. 2.
203. Wainright M. (1999). "Who did invent the Petri dish? The mystery deepens...", Microbiology Today, Vol. 26, p13.
204. Watkins G. H., Burriel A. R. and Jones J. E. T. (1991). A field investigation of subclinical mastitis in sheep in Southern England. British Veterinary Journal, 147, 413-420.
205. Weihuan F. and Sandholm M. (1995). Inhibition of the protease activity in mastitic milk. Journal of Dairy Research 62 (1), 61-8.
206. Williams D. J. (1986). A modification to the Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test suitable for goat's milk. Australian Journal of Dairy Technology. 41, 28-30.
207. Williams D. J., and Nottingham S. M. (1990). Suitability of a modification to the Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test or goats' milk: Collaborative study. Australian Journal of Dairy Technology. 45, 21-23.
208. Wright R. C. and Tramer J., (1956). Reactivation of milk phosphatase following heat treatment IV. The influence of certain metallic ions. Journal of Dairy Research. 23, 248-256.
209. World Health Organization (WHO). Food safety fact sheet, 04 June 2019. Available at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Accessed on 06 Aug 2019.
210. Yoshitomi K. (2004). "Alkaline phosphatase activity in cheeses measured by fluorometry", International Journal of Food Science and Technology, 39, 349 – 353.
211. Yu L., Shi Z., Fang C., Zhang Y., Liu Y., Li C., (2015). "Disposable lateral flow-through strip for smartphone camera to quantitatively detect alkaline phosphatase activity in milk", Biosensors and Bioelectronics, 69, 307-315.
212. Zadoks R. N., Gonzalez R. N., Boor K. J., Schukken Y. H. (2004). Mastitis-causing streptococci are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. Journal of Food Protection 67 (12), 2644-2650.

- 213.** Zamuner F., Digiacomio K., Cameron A. W. N., Leury B. J., (2020). Effects of month of kidding, parity number, and litter size on milk yield of commercial dairy goats in Australia. *Journal of Dairy Science* **103**, 954–964. doi:10.3168/jds.2019-17051.
- 214.** Zastempowska E., Grajewski J., Twarużek M. (2015). Food-borne pathogens and contaminants in raw milk – a review, *Annals of Animal Science*, DOI: 10.1515/aoas-2015-0089.
- 215.** Zimbro M. J. and Power D. A. (2003): *Difco and BBPL Manual*, Maryland: Beckton, Dickinson and Company.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ανυφαντάκης Ε. (1986). Χημεία και ανάλυση του γάλακτος, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.
2. Αρβανιτογιάννης Ι. Σ., Σάνδρου Δ. και Κούρτης Λ. (2001). Ασφάλεια Τροφίμων, Εφαρμογή της Ανάλυσης Επικινδυνότητας και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (HACCP) στις βιομηχανίες Τροφίμων και Ποτών, σελ. 76-78, Εκδόσεις University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
3. Διεθνής Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων (1999). Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1255/1999, όσον αφορά τις μεθόδους που πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ανάλυση και της αξιολόγηση της ποιότητας γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων.
4. Ζυγογιάννης Δ. και Κατσαούνης Ν. (1984). Επίδραση του αριθμού και του γενοτύπου των γαλουχουμένων αρνιών στη ποσότητα και τη σύνθεση του γάλακτος των καραγκούνικων προβάτων. Επιστ. Επετ. Κτηνιατρικής Σχολής Α.Π.Θ. 1984,22:1-56.
5. Καλατζόπουλος Γ. (1986). Μαθήματα εφαρμοσμένης μικροβιολογίας γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, Α΄ και Β΄ μέρος, Εκδόσεις Καραμπελόπουλος, Αθήνα.
6. Καλατζόπουλος Γ. (1994). Η σημασία της ποιότητας του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων, Πρακτικά επιμορφωτικού σεμιναρίου στην Γαλακτοκομία της Εθνικής Επιτροπής Γάλακτος, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα 4.
7. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 852/2004 Κεφ. VIII, XII.
8. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ, περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. www.europarl.eu.int
9. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ, περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. www.europarl.eu.int
10. Κατσαούνης Ν. (1986) Προβατοτροφία. Αφοί Κυριακίδη. Θεσσαλονίκη.
11. Κοτανίδης Γ, (2003) Συμβολή στην μελέτη και την πρόληψη των μαστίτιδων των προβάτων, Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Κτηνιατρική Σχολή, Κλινική Μαιευτικής και Τεχνητής Σπερματέγχυσης.
12. Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής χρήσης (2003). Μέρος Α΄ - Τρόφιμα και Ποτά, Τόμος 2. Ελληνική Δημοκρατία, Υπουργείο Οικονομίας και Οικονομικών, Γενικό Χημείο του Κράτους, Εθνικό τυπογραφείο, Αθήνα.

13. Μάντης Α. (1993) Υγιεινή και Τεχνολογία του Γάλακτος και των Προϊόντων του. Εκδ. οικ. Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε., Θεσσαλονίκη.
14. Μάντης Α. (2000) Υγιεινή και Τεχνολογία του Γάλακτος και των Προϊόντων του. Εκδ. οικ. Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε., Θεσσαλονίκη.
15. Μάντης Α., Παπαγεωργίου Δ., Φλετούρης Δ., Αγγελίδης Α. (2015) Υγιεινή και Τεχνολογία του Γάλακτος και των Προϊόντων του. Εκδ. οικ. Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε., Θεσσαλονίκη.
16. Μαργαρίτης Λ., Ζαράνη Φ. Βιολογία κυττάρου, Ηλεκτρονική Μικροσκοπία. http://multimedia.biol.uoa.gr/BK_Labs_TEM.pdf.
17. Μαργαρίτης και Ζαράνη (2001).
18. Μασούρας Θεόφιλος. Ελληνική Γαλακτοκομία: ‘Μοχλός’ εξόδου μας από την κρίση. *Dairy News, Δεκέμβριος (2015)*. <https://www.dairynews.gr/2017/04/13/%CE%B5%CE%BB%CE%BB%CE%B7%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%AE%CE%B3%CE%B1%CE%BB%CE%B1%CE%BA%CF%84%CE%BF%CE%BA%CE%BF%CE%BC%CE%AF%CE%B1%CE%BC%CE%BF%CF%87%CE%BB%CF%8C%CF%82-%CE%B5%CE%BE%CF%8C/>
19. Οδηγία της Κοινότητας 92/46, για τη θέσπιση των υγειονομικών κανόνων για την παραγωγή και την εμπορία νωπού γάλακτος, θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος και προϊόντων με βάση το γάλα.