

DETERMINAZIONE DELLA FOSFATASI ALCALINA NEL LATTE: CONFRONTO TRA METODICHE E STRUMENTI

Elena BUFFOLI¹, Francesca FUSI¹, Giuseppe BOLZONI^{1*}

RIASSUNTO - La determinazione della Fosfatasi Alcalina è il principale indicatore di corretta pastorizzazione del latte; il limite legale è fissato in 350mU/L (Reg. CE 1664/2006). In questo lavoro sono stati confrontati due diversi strumenti per la determinazione dell'attività fosfatasi presente nei campioni: lo strumento Fluorophos® Test System, in uso presso il Laboratorio, che si basa su una reazione fluorimetrica, e lo strumento F-AP™ Fast Test with novaLUM™, di più facile e rapido impiego, che sfrutta, invece, il principio della chemiluminescenza. Sono stati analizzati complessivamente oltre 100 campioni di latte di specie differenti e titolo in grasso diverso, crudi o sottoposti a trattamento termico. Al fine di permettere le valutazioni di confronto, il risultato ottenuto in fluorimetria è stato assunto come valore di riferimento senza che ciò lo definisca come “valore reale”. Dal punto di vista quantitativo è emersa una tendenza alla sovrastima dello strumento basato sulla chemiluminescenza, che conferma osservazioni precedenti di altri autori (Albillos *et al* 2008). Risultati più concordanti si osservano, invece, se si considerano i dati del confronto dal punto di vista qualitativo: le capacità di discriminazione tra prodotti correttamente pastorizzati e prodotti trattati in modo insufficiente o crudi coincide nella quasi totalità dei campioni analizzati.

Parole chiave: latte, fosfatasi alcalina, Fluorophos®, F-AP™

SUMMARY - Determination of alkaline phosphatase activity in milk: comparison between methods and instruments - The Alkaline Phosphatase is a heat susceptible enzyme and its detection is used as retrospective indicator for milk pasteurization. The legal limit that guarantees a successful pasteurization is <350 mU/L (Reg. CE 1664/2006). In this study the ALP activity was determined by using two different analytical methods: the first, commonly applied in our Laboratory, is based on a fluorescence reaction and employs the Fluorophos®; the second is easier and quick to perform is based on chemiluminescence principle and uses the F-AP™. About 100 different samples were analyzed including milk samples of different species with a variable quantity of fat, both raw and heat-treated. The Fluorophos® results were used as reference values for the comparison, even if they are not “true values”. Overall results show an overestimation trend of chemiluminescence *vs* fluorimetric technique that confirms previous observations of Albillos *et al* (2008). More

* Corrispondenza ed estratti: crn.qualita.latte@izsler.it

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna - Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte Bovino. Via Bianchi 9, Brescia

similar results in almost all samples analyzed were observed in term of qualitative outcome i.e. the ability to correctly identify the milk pasteurization and to discriminate between well-pasteurized and raw or insufficient heat-treated products.

Keywords: milk, Alkaline Phosphatase, Fluorophos®, F-AP™

INTRODUZIONE

La fosfatasi alcalina (ALP) è una metallo proteina presente nel latte, legata ai globuli di grasso, caratterizzata da resistenza al calore leggermente superiore a quella di *Coxiella burnetii* (microrganismo patogeno considerato termine di riferimento per la termoresistenza dei patogeni).

Sin dagli anni 1930 la determinazione quantitativa della fosfatasi è stata riservata al controllo del latte alimentare pasteurizzato, durante la sua vita commerciale [1, 2]; relativamente più recenti sono l'applicazione nel controllo di prodotti derivati dal latte o di altro tipo (succhi di frutta, prodotti farmaceutici, gelati, yogurt, panna), le verifiche di genuinità di alcuni prodotti (formaggi a base di latte crudo con divieto di termizzazione) e, soprattutto, i controlli di processo nella produzione dei formaggi a base di latte pasteurizzato [3]. Anche a livello Normativo l'attenzione verso questo parametro si è recentemente riattivata; alcune dispute commerciali internazionali hanno infatti evidenziato difficoltà di definizione ed uniformazione dei limiti di sicurezza alimentare e quindi di giudizio di conformità nell'import-export dei formaggi. Oltre alle particolari caratteristiche di alcune tipologie di formaggi, uno degli aspetti problematici è proprio l'esistenza di differenti tecniche analitiche (chemiluminescenza e fluorimetria) applicate nei diversi paesi [4, 5].

In prospettiva, è probabile che il controllo dell'attività fosfatasica nelle fasi del processo di caseificazione e sui prodotti finiti nel corso della loro vita commerciale sia destinata a diventare un fattore di controllo più frequente e diffuso. In quest'ambito, quindi, la disponibilità di strumenti di rapido e semplice impiego in grado di fornire informazioni dirette agli operatori del settore potrebbe rilevarsi

particolarmente utile nel prossimo futuro.

In quest'ottica, è stata realizzata la presente prova di confronto tra la metodica fluorimetrica in uso presso il Laboratorio dell'IZSLER con lo strumento Fluorophos® Test System (Advanced Instruments, Inc., Norwood, US), e la metodica chemiluminescente con lo strumento F-AP™ Fast Test with novaLUM™ (Charm Sciences Inc., US), in collaborazione con il distributore italiano Alitest Srl di Mantova.

MATERIALI E METODI

Il confronto tra le due strumentazioni è stato effettuato analizzando oltre 100 campioni di latte bovino di varie tipologie: crudo, pasteurizzato (intero e parzialmente scremato), UHT (intero, parzialmente scremato, scremato) reperiti in commercio o allestiti e trattati in laboratorio a partire da latte di massa aziendale. Per le valutazioni di linearità strumentale del F-AP™ sono stati analizzati anche campioni di latte caprino e bufalino, trattati termicamente e diluiti con quantità progressive e scalari di latte crudo, previamente testato, per ottenere valori "attesi" di ALP.

Per il confronto, le analisi con lo strumento Fluorophos® sono state eseguite in singola replica assumendo come limiti di variabilità quelli stimati in funzione della ripetibilità strumentale attesa ed assumendo quindi come esito finale il risultato dell'unica replica eseguita; mentre le analisi con lo strumento F-AP™ sono state condotte sempre in doppia replica (F-AP™ min e F-AP™ max) così da disporre sempre del valore di ripetibilità ed assumendo come esito finale il valore medio (F-AP™ media). La ripetibilità teorica del Fluorophos® in dotazione è stata comunque verificata su 15 campioni di diversa tipologia risultando conforme alle attese.

Tutti i campioni di latte crudo analizzati con il Fluorophos® sono stati diluiti 1:100 secondo quanto indicato dal Metodo di Prova al fine di ottenere valori compatibili con il campo di misura dello strumento, mentre con il F-AP™ è stato possibile eseguire direttamente le determinazioni sul latte tal quale (secondo le istruzioni fornite dai produttori nei rispettivi “Manuale dell’Operatore”).

Nel corso del lavoro sono stati condotti anche ulteriori test con differenti finalità, così sintetizzabili (dati non pubblicati):

- Valutazione della ripetibilità strumentale F-AP™
- Valutazione dell’effetto della temperatura del campione sulla determinazione analitica
- Test di confronto tra lotti di produzione dei reagenti F-AP™
- Replica delle prove di confronto realizzate da Albillos *et al.* 2008 [6].

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Confronto tra strumenti - In figura 1 sono rappresentati i campioni di latte crudo ordinati secondo il valore di ALP ottenuto con la metodica fluorimetrica. E’ osservabile una sottostima, limitata ma abbastanza diffusa, rispetto ai risultati ottenuti con la tecnica di chemiluminescenza del F-AP™. La differenza appare tendenzialmente meno accentuata al crescere del livello di fosfatasi; 18 casi su 33 (54,5%) forniscono risultati sovrapponibili se si considerano anche i limiti di variabilità delle misure. Da un punto di vista qualitativo, tutti i campioni analizzati risulterebbero comunque correttamente classificabili come “latte crudo” da ambedue gli strumenti.

In figura 2, il medesimo tipo di confronto, è focalizzato su campioni di latte con valori di ALP inferiori, corrispondente in linea di massima a latte trattato termicamente ma non propriamente pastorizzato. Anche in

Figura 1 - Confronto tra le letture dei due strumenti per campioni di latte con valore di ALP superiore a 100.000 mU/L

Figure 1 - Comparison between instruments: milk samples with ALP >100.000 mU/L

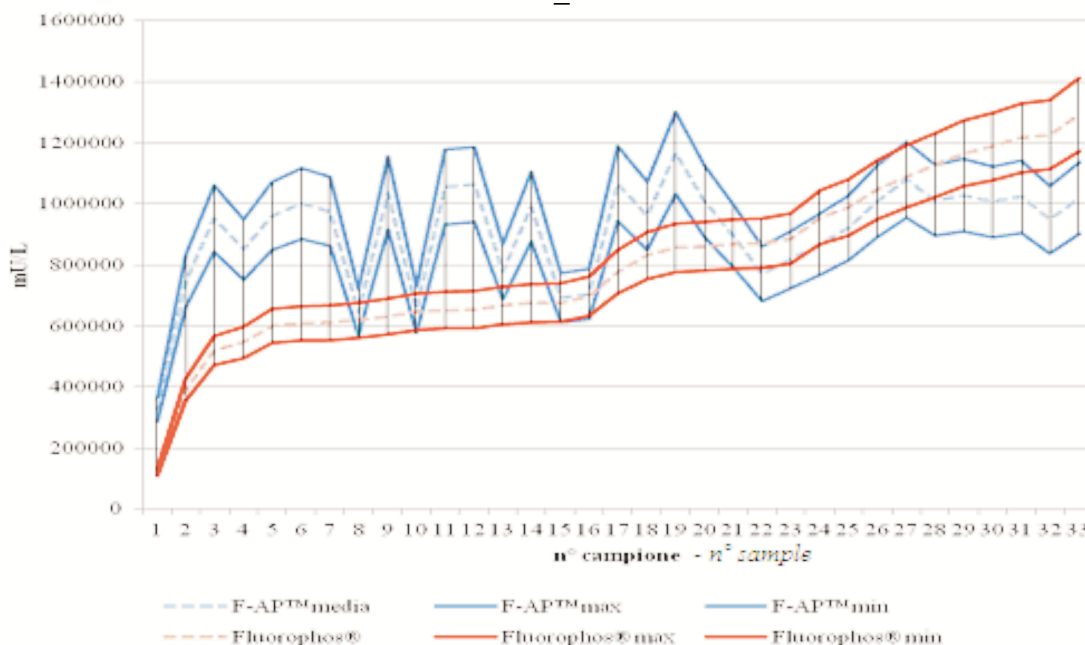
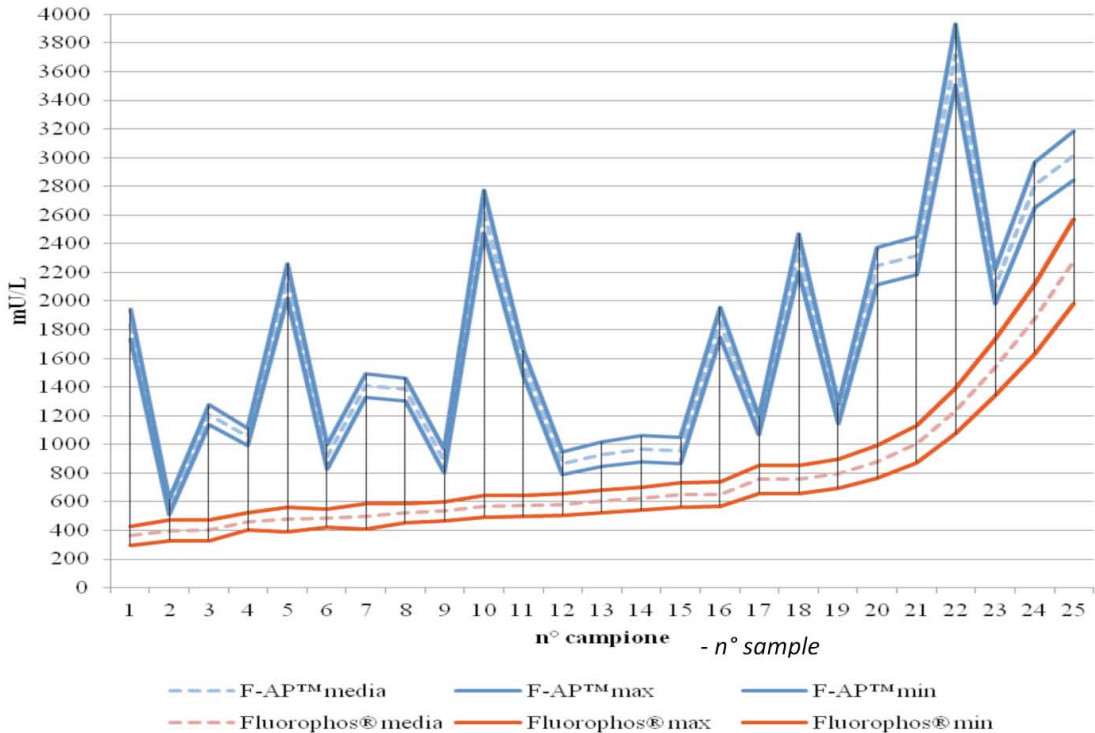


Figura 2 - Confronto tra le letture dei due strumenti per campioni di latte con valore di ALP compresi tra 350 e 2.500mU/L

Figure 2 - Comparison between instruments: milk samples with ALP from 350 to 2500mU/L



questo range, si confermerebbe la tendenza alla sovrastima degli esiti del F-AP™, con aree di sovrapposizione però in questo caso sostanzialmente assenti. Va sottolineato che si tratta di campioni con ridotta attività fosfataseica e, soprattutto, che ambedue gli strumenti in quest'ambito offrono prestazioni di ripetibilità decisamente migliori (e ciò riduce di conseguenza la variabilità attesa). Anche in figura 3, incentrata su campioni con minimi contenuti di ALP corrispondenti quindi a latte pastorizzato, la tendenza alla sovrastima appare ancora apprezzabile, anche se meno costante con 19 casi su 41 (46,3%) di sovrapposizione ed anche alcuni casi di sottostima dello strumento F-AP™. Questi campioni sono prossimi al limite di rilevabilità di entrambi gli strumenti, per cui il confronto quantitativo perde gran parte

della sua significatività: qualitativamente 35 campioni su 41 (85%) forniscono giudizio coincidente (<350 mU/L).

In sintesi quindi dal confronto effettuato emerge per lo strumento F-AP™, rispetto alla metodica fluorimetrica, una leggera tendenza alla sottostima per i valori molto bassi ed una sovrastima più consistente per i valori superiori che diventa infine trascurabile nel caso del latte crudo.

Una valutazione più diretta dei risultati ottenuti può essere dedotta dalla quantificazione percentuale delle differenze medie tra i due strumenti visibile in tabella 1, con i campioni suddivisi in classi. Questa valutazione assembla tutti i campioni confrontati, indipendentemente dal tipo commerciale (titolo in grasso e trattamento termico), e fornisce quindi un valore medio complessivo

Figura 3 - Confronto tra le letture dei due strumenti per campioni di latte con valore di ALP compresi tra 0 e 350 mU/L

Figure 3 - Comparison between instruments: milk samples with ALP from 0 to 350 mU/L

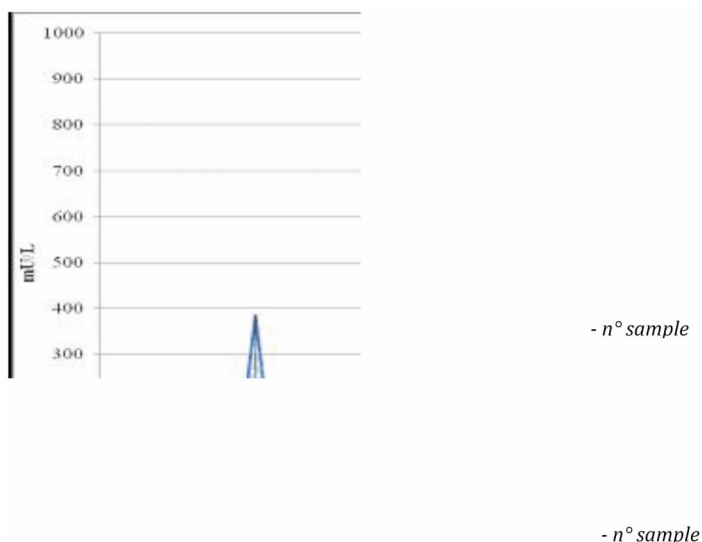


Tabella 1 - Confronto tra strumenti: differenza tra risultati quantitativi (riferimento Fluorophos®; tutti i campioni)

Table 1 - Comparison between instruments: difference of quantitative results (Reference Fluorophos®; all samples)

ALP per Fluorophos® (mU/L) ¹	N° camp. N° samples	% differenza di lettura F-AP™/Fluorophos® ¹
0-150	24	- 2%
150-500	24	+ 51%
500-5.000	20	+ 113%
> 5.000	35	+ 21%

¹Difference F-AP™/Fluorophos® (%)

della differenza osservata. Come già accennato, le differenze rilevate non riguardano la “correttezza” del risultato finale: il valore ottenuto con il Fluorophos® costituisce, infatti, il riferimento per il confronto, ma non necessariamente il valore più rispondente al “valore vero”.

A conferma di ciò, è sufficiente osservare in tabella 2 come si modificerebbero le differenze percentuali medie ordinando i dati in funzione dei livelli di ALP forniti, questa volta, dallo strumento F-AP™ e assunti come valori di riferimento.

Da un punto di vista pratico, l’aspetto più

Tabella 2 - Confronto tra strumenti: differenza tra risultati quantitativi (Riferimento FAPTM; tutti i campioni)
 Table 2 - Comparison between instruments: difference of quantitative results (Reference FAPTM ; all samples)

ALP per F-AP TM (mU/L)	N° camp. N° samples	% differenza di lettura F-AP TM /Fluorophos® ¹
0-150	21	- 41%
150-500	16	+ 68%
500-5.000	29	+ 123%
> 5.000	37	+ 29%

¹Difference F-APTM/Fluorophos® (%)

importante del confronto è quello che riguarda il giudizio qualitativo dei prodotti sottoposti ad analisi. A questo scopo si sono selezionati i risultati compresi tra 0 e 750 mU/L, suddividendoli poi per tipologia di campione e per coincidenza di valutazione tra i due strumenti (Tab. 3).

La coincidenza è risultata completa per i campioni di latte pastorizzato e UHT. Da considerare concordi anche le valutazioni sui 3 campioni di latte “pasteurizzato” che hanno fornito, con entrambi gli strumenti,

valori superiori al limite normativo. Uguale osservazione va riservata ai 12 campioni di latte UHT nei quali si è rilevata una quantità di ALP assolutamente incoerente con il valore atteso, con ambedue le tecniche analitiche. Tale fenomeno, tutt'altro che raro, può essere attribuito ad una riattivazione enzimatica a seguito probabilmente di un'erronea conservazione del prodotto a temperature eccessive. I casi di mancata concordanza riguardano invece 5 campioni su 25. Soltanto uno di questi (latte bovino scremato) ha dato un

Tabella 3 - Confronto tra strumenti: risultati qualitativi
 Table 3 - Comparison between instruments: qualitative results

Tipologia Type	Valore atteso ALP (mU/L) ¹	Valore ottenuto ALP (mU/L) ²	N° campioni N° samples	
			Fluorophos®	F-AP TM
Pasteurized	< 350	< 350	23	23
		> 350	3	3
U.H.T.	< 350	< 350	3	3
		> 350	12	12
Diluizioni latte crudo ³	< 350	< 350	15	10
		> 350	2	7
	> 350	< 350	-	-
		> 350	8	8

¹ALP expected value; ²ALP observed value; ³Dilutions of raw milk

esito significativamente più elevato con lo strumento F-APTM (897 vs 337 mU/L), mentre negli altri 4 casi (2 capra intero, 1 bovino scremato, 1 bovino intero) la sovrastima osservata, sufficiente a superare il limite legale che definisce il punto di discriminazione tra pastorizzato e non, era di entità piuttosto limitata.

2. Prova di linearità - La prova è stata realizzata su tutto il campo di misura sebbene l'utilizzo primario di questi strumenti sia il controllo di valori prossimi al limite di conformità del trattamento termico del latte. La determinazione del valore "atteso" per le singole diluizioni è stato calcolato, per ciascuno strumento, a partire dal "valore osservato" nel campione di latte crudo di partenza. Gli scarti rispetto ai valori attesi sono stati statisticamente elaborati per specie (bovino, caprino, bufalino) e tipologia di latte

(intero, scremato): a titolo di esempio in tabella 4 vengono riportati i risultati relativi al latte bovino intero.

Nella figura 4 è invece appreso l'andamento complessivo degli scarti osservati per tutte le tipologie di latte esaminato. Pur essendo presenti singoli casi di notevoli scostamenti dai valori attesi, la distribuzione degli scarti appare complessivamente raccolta e, soprattutto, coincidente tra gli strumenti. Come previsto, oltre a sporadici casi di elevato scarto per contenuti di ALP molto limitati, l'area di minor uniformità è rappresentata dai campioni di latte crudo t.q. Come già accennato, la necessità di ricorrere per questi ultimi campioni (quantomeno per valori oltre 20.000 mU/L) alla diluizione 1:100 per lo strumento Fluorophos®, rende sostanzialmente non confrontabili i risultati dei due strumenti.

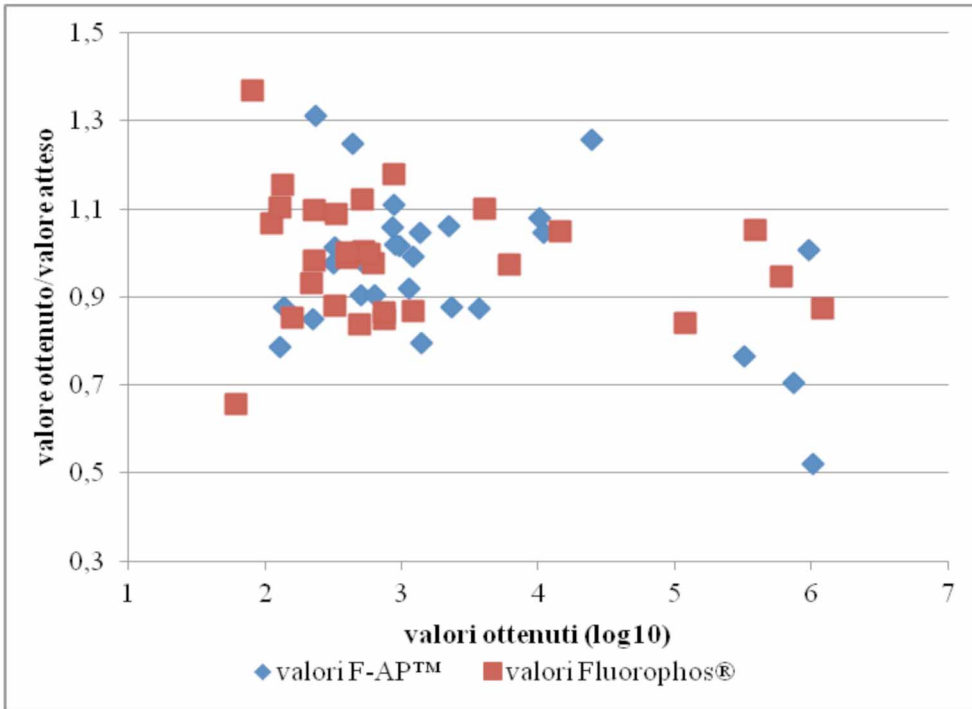
Tabella 4 - Prova di linearità: scarti tra valore ottenuto e valore atteso (solo latte bovino crudo intero)
Table 4 - Linearity Test: differences between expected and observed values (only whole, raw bovine milk)

Diluizione latte crudo ¹	F-AP TM			Fluorophos®		
	Valore ottenuto (Media) ²	Valore atteso (mU/L)	Valore ottenuto/valore atteso ³	Valore ottenuto (mU/L)	Valore atteso (mU/L)	Valore ottenuto/valore atteso ³
Crudo tq. ⁴	960.759	<u>954.191</u>	1,0069	601.300	<u>636.071</u>	0,9453
1 a 100	10.309	9541,9	1,0804	6.197	6360,7	0,9743
1 a 1000	969,5	954,2	1,0160	621,5	636,1	0,9771
1 a 1200	882,5	795,2	1,1098	532,8	530,1	1,0052
1 a 1700	507,5	561,3	0,9042	329,1	374,2	0,8796
1 a 3000	322	318,1	1,0124	232,6	212,0	1,0970
1 a 6000	139,5	159,0	0,8772	113,1	106,0	1,0669
Past. ⁵	0	0	-	<10	0	-

¹Dilution of raw milk; ²Observed value (mean); ³Observed values/Expected values

⁴Not diluted raw milk ; ⁵Pasteurized

Figura 4 - Prova di linearità: scarti tra valore ottenuto e valore atteso per tutte le tipologie di latte
 Figure 4 - Linearity Test: differences between expected and observed values (all samples)



Valore ottenuto / Valore atteso – Observed value/ Expected value

Di conseguenza si ritiene più significativa la rappresentazione offerta in figura 5 che, dopo trasformazione logaritmica dei dati ed esclusione delle aliquote > 20.000 mU/L, mostra il tracciato delle rette di regressione che permettono di apprezzare più direttamente il simile comportamento dei due strumenti. A scopo informativo si riporta, comunque, la formula della regressione ottenibile per lo strumento F-AP™ su tutti i campioni analizzati (compresi quindi quelli di latte crudo), che non differisce in modo significativo da quella indicata nella figura 1:

$$y = 0,9669x + 0,0905 \quad R^2 = 0,9961$$

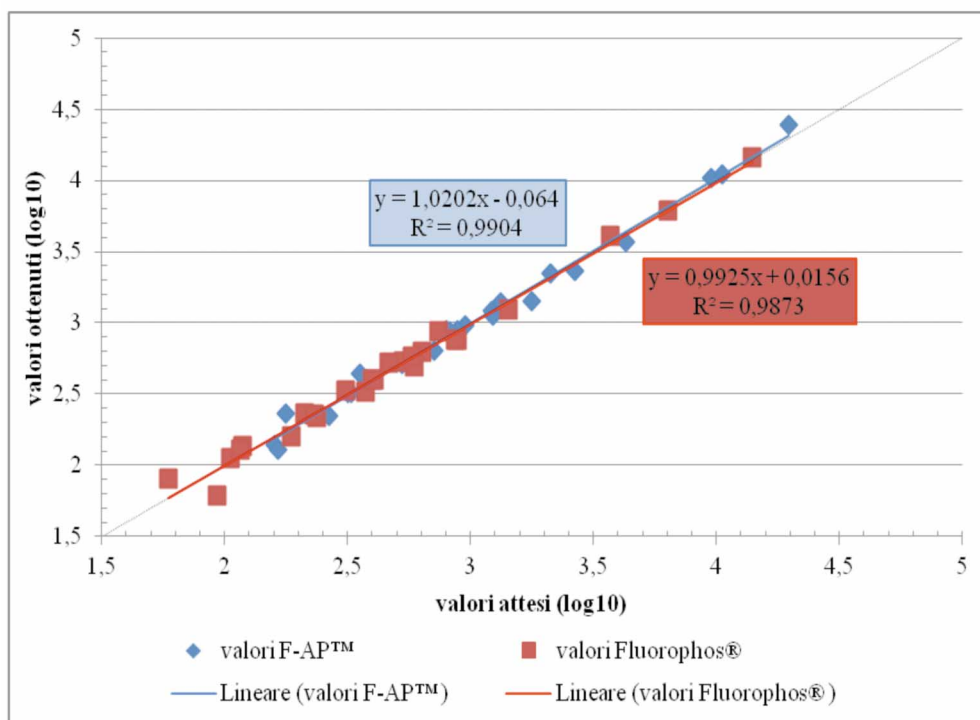
CONCLUSIONI

Tenuto conto delle specifiche condizioni in cui la prova di confronto è stata realizzata, è risultato complessivamente confermato un certo livello di sovrastima degli strumenti

basati sulla chemiluminescenza rispetto a quello fluorimetrico in uso presso il laboratorio. I risultati ottenuti del resto confermano quelli già segnalati da Albillos *et al* nel 2008, che ha confrontato il Fluorophos® con differenti tipi di strumenti a chemiluminescenza. Per quanto riguarda le valutazioni qualitative, relative alla capacità di differenziare prodotti correttamente pastorizzati da quelli crudi o trattati in modo parziale, si sono comunque ottenuti esiti soddisfacenti, anche considerando che, in alcuni casi, si sono appositamente create condizioni “borderline” (con la miscelazione di latte crudo e trattato termicamente), in cui anche una minima differenza analitica poteva determinare un giudizio differente.

Al di là delle valutazioni tecniche sulle differenti metodiche, riteniamo importante sottolineare che lo strumento F-AP™ si

Figura 5 - Prova di linearità: rette di regressione dei due strumenti (esclusi campioni di latte crudo)
 Figure 5 - Linearity Test: Regression lines of two instrument (raw milk samples excluded)



Valori ottenuti – *Observed values*; Valori attesi – *Expected values*

inserirsi tra quelli di semplice e pronto uso nelle condizioni di campo (quali i controlli di processo, in tempo reale, in linea di produzione), in quanto non richiede competenze ed attrezzature tipiche dei laboratori specialistici ai quali sono invece destinate le strumentazioni più complesse

e delicate come il Fluorophos®.

Ringraziamenti:

Poster presentato al 3° Congresso Lattiero-Caseario AITeL-Regione Lombardia, Milano 28 settembre 2012 “Latte e derivati: la ricerca e l’innovazione”.

BIBLIOGRAFIA

- 1) International Organization for Standardization (ISO) 11816-1 IDF 155-1; 1997 (E)
- 2) International Organization for Standardization (ISO) 22160 IDF 209 2007 (E)
- 3) International Organization for Standardization (ISO) 11816-2 IDF 155-2 2003 (E)
- 4) Alkaline Phosphatase testing for milk pasteurization. Cornell University, Dairy Foods Science Notes, version 11-07
- 5) Salter R, Fitchen J (2006) Evaluation of a chemiluminescence method for measuring Alkaline Phosphatase Activity in whole milk of multiple species and bovine dairy drinks: interlaboratory study. J AOAC Int 89(4) 1061-1070
- 6) Albillos SM, Reddy R, Salter R (2008) Comparison of phosphatase methods used for milk pasteurization verification. 122nd AOAC Annual Meeting and Exposition, Dallas

