

DETERMINAZIONE DELLA FOSFATASI ALCALINA NEL LATTE: STABILITA' A LUNGO TERMINE DEI CAMPIONI

Elena BUFFOLI¹, Monica GRAMAGLIA², Anna Maria FERRINI³, Nicoletta MARTINELLI¹,
Giuseppe BOLZONI^{*1}

RIASSUNTO - Con il presente lavoro si fornisce una indicazione circa la stabilità nel tempo dell'attività fosfatasi in campioni di latte crudo e pastorizzato conservati in congelatore a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. La conservazione è stata protratta per sei mesi, periodo considerato più che sufficiente a simulare le condizioni che si possono verificare nello svolgimento della procedura di revisione di analisi di campioni legali, non conformi, da parte del Laboratorio Nazionale di Riferimento dell' I.S.S. in applicazione della Legge 283/1962 e 441/1963, in tema di sicurezza alimentare. A partire dal 146° giorno, l'attività fosfatasi, eseguita con il metodo fluorimetrico (ISO 11816-1:2013), ha evidenziato un decremento statisticamente significativo, quantificabile tra il 10 e il 20%, rispetto al valore iniziale osservato sul latte refrigerato di partenza. Il calo è risultato più evidente nel latte crudo rispetto a quello pastorizzato. Sulla base dei risultati ottenuti, è stato possibile definire, prudenzialmente, come appropriato un limite massimo di conservazione in congelatore di 90 giorni per garantire risultati analitici affidabili in ambito di controllo ufficiale. Le nostre osservazioni dimostrano che, anche in caso di periodi di conservazione più prolungati, la parziale riduzione dell'attività fosfatasi permette di ottenere risultati analitici relativamente affidabili seppur con opportune interpretazioni in funzione del tipo di campione e dello scopo dell'analisi.

Parole chiave: latte, fosfatasi alcalina, conservazione campioni, latte congelato

ABSTRACT - Alkaline phosphatase determination in milk: long term stability of samples - The stability of alkaline phosphatase (ALP) activity in raw and pasteurized milk samples stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ was tested over a period of six months to widely cover the maximum time allocated by the Italian Law n° 283/1962 (modified by law n. 441/1963) to National Reference Lab (Istituto Superiore di Sanità), in case of "revisione analisi" (confirmation of results by the NRL on legal samples in case of not compliance with food legislation). Scope of the study was to evaluate the correct extent of time to perform the ALP determination according to ISO 11816-1 in frozen milk samples. The ALP activity decrease in frozen milk samples resulted significant starting from day 146 and was quantified under 10-20% of the initial values (more evident in raw milk). On the basis of these results, a conservative storage

* Corrispondenza ed estratti: giuseppe.bolzoni@izsler.it, Tel 0039 0302290541

¹ IZSLER - Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovina. Via Bianchi 9, 25125 Brescia

² IZSPLV - Laboratorio Centro Latte. Via Bologna 148, 10154 Torino

³ Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio Nazionale di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte.
Viale Regina Elena 299. 00161 Roma

limit of 90 days seems to be more appropriate for frozen milk samples stored for this determination in the frame of the official control. Nevertheless, our observations demonstrate that even more prolonged storage periods, regardless of the type of samples analyzed, produced only a partial decrease of ALP activity, allowing in any case the interpretation of the result.

Key words: milk, alkaline phosphatase, frozen milk

INTRODUZIONE

A seguito di un disguido nel corso di una procedura di revisione di analisi (Legge 283/1962 [1] e 441/1963 [2]) per un campione ufficiale di latte destinato alla determinazione quantitativa della fosfatasi alcalina (ALP), indicatore di corretta pastorizzazione, sono emerse differenti opinioni tra “addetti ai lavori” in merito alla modalità ed ai tempi di conservabilità dei campioni di latte per l'esecuzione di tale analisi.

Come noto, il latte è una matrice facilmente deperibile, difficile da conservare per la replica di analisi di laboratorio nel tempo ma, d'altra parte, l'utilizzo del metodo fluorimetrico per la determinazione della fosfatasi su campioni congelati è prassi abbastanza diffusa per i controlli di screening realizzati nei laboratori.

In assenza di esaurienti indicazioni in merito e di specifici riferimenti in letteratura, il Laboratorio Nazionale di Riferimento dell'Istituto Superiore di Sanità ha coordinato la progettazione e l'esecuzione di uno studio sperimentale sull'argomento presso i laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) di Torino e di Brescia.

Scopo del lavoro, dunque, è stato verificare la stabilità dell'enzima fosfatasi alcalina in campioni di latte conservati in congelatore a -18°C . Il progetto è stato realizzato in un arco di tempo di 6 mesi, considerato più che sufficiente rispetto ai tempi tecnici in genere necessari, anche in condizioni meno favorevoli, per completare le procedure previste per la ripetizione/revisione di analisi in ambito di controlli ufficiali a valenza legale.

MATERIALI E METODI

I due laboratori IIZZSS hanno allestito,

in modo indipendente, idonee quantità di:

- latte pastorizzato, con valori di ALP inferiori a 350 mU/L (limite legale Reg. 1664/2006 [3])

- latte crudo, con valore < 7.000 mU/L (diluito 1:100 con latte privo di fosfatasi per rientrare nel limite del campo di misura strumentale)

Le due matrici di partenza sono state suddivise, dopo accurata miscelazione e blando riscaldamento ($< 38^{\circ}\text{C}$), in aliquote, in parte refrigerate ($4^{\circ}\text{C} \pm 2$) ed in parte congelate ($-18^{\circ}\text{C} \pm 3$).

I due laboratori hanno quindi applicato il medesimo protocollo operativo per l'esecuzione delle analisi, sia in termini di cadenza, che di modalità (metodo fluorimetrico, Norma ISO 11816-1:2013 [4]; strumento Fluorophos® Test System, Advanced Instruments, US).

Il lavoro si è svolto in 4 fasi:

- Fase 1: controlli ed allestimento delle matrici di partenza, con successiva aliquotazione e refrigerazione.

- Fase 2: determinazioni analitiche di 2 aliquote in duplice replica, sia refrigerate che congelate, per 2 giorni consecutivi.

- Fase 3: determinazioni analitiche, a frequenza settimanale, di 2 aliquote in duplice replica, fino al 45° giorno.

- Fase 4: stessa modalità della fase 3, ma con cadenza quindicinale fino a completamento dei 6 mesi del progetto.

I risultati delle singole determinazioni analitiche ottenuti dai due laboratori sono stati raccolti in fogli elettronici Excel, per le valutazioni statistiche (definizione valori di riferimento, analisi della varianza e stima della regressione).

In ogni sessione di lavoro ambedue i la-

boratori hanno verificato e registrato le performances strumentali previste dal metodo di prova: Daily A/D test e Reagent Control.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella tabella 1 vengono riportate le medie aritmetiche delle determinazioni analitiche eseguite da entrambi i laboratori IIZZSS, sulle due tipologie di latte (crudo e pastorizzato), sulle aliquote refrigerate e congelate, nella fase 2.

Le medie ottenute dalle aliquote refrigerate (R) sono state assunte come valore di riferimento per la successiva valutazione della stabilità dell'attività enzimatica nei campioni sottoposti a congelamento.

Le medie ottenute sui campioni congelati al 1° e 2° giorno, non mostrano evidenti scostamenti rispetto alle refrigerate, tenuto conto anche dell'incertezza di misura analitica; i singoli risultati sono stati comunque confrontati tramite analisi della varianza (ANOVA) con quelli osservati sui campioni refrigerati, come prima fondamentale verifica dell'assenza di significative variazioni indotte dal congelamento.

Una prima valutazione dei risultati ottenuti sulle aliquote congelate nel restante periodo di osservazione (Fasi 3 e 4) è fornita, per ciascun Laboratorio e per ciascuna tipologia di campione, nelle figure 1, 2, 3 e 4. In Asse Y è riportato il risultato del rapporto (ratio) tra valore medio di ciascuna seduta

di lavoro (indicato nel grafico con quadratini rossi) rispetto al valore di riferimento definito in precedenza (la distribuzione delle singole analisi è rappresentata dai pallini rossi). In caso di assoluta coincidenza delle osservazioni con i valori di riferimento si osserverebbe quindi un rapporto pari ad 1. La retta di regressione stimata dall'insieme dei valori di rapporto fornisce un'indicazione complessiva dell'andamento delle osservazioni nella scala di tempo dell'intero periodo di prova (Asse X).

Dall'andamento delle rette di regressione si dovrebbe dedurre il progressivo calo dell'attività fosfataseica nelle aliquote congelate rispetto al contenuto del medesimo latte nei primi due giorni di conservazione in frigorifero (pendenza della retta di regressione rispetto a quella teorica ottimale costante sul valore di rapporto = 1). E' però altrettanto evidente che:

- L'entità del calo appare decisamente ridotta nel caso del latte pastorizzato e sovrapponibile tra i due Laboratori.

- L'entità del calo per il latte crudo appare più consistente e relativamente differente tra i due laboratori.

Per valutazioni più precise va ovviamente considerato innanzitutto la componente di variabilità legata alla metodica analitica (riproducibilità indicata < 24 % nel 95% dei casi per contenuti compresi tra 125 e 620 mU/L secondo la Norma ISO 11816-1:2013).

Tabella 1 - Medie aritmetiche dell'attività fosfataseica nel latte crudo e pastorizzato, refrigerato e congelato, di entrambi i laboratori

Table 1 - Mean values of ALP activity for pasteurized and raw milk, according to storage conditions as reported by both labs

Matrice	Refrigerato/Congelato	Giorno	Media mU/L (DS)	Media mU/L (DS)
Matrix	Refrigerated/Frozen	Day	Mean mU/L (SD)	Mean mU/L (SD)
			Lab. 1	Lab. 2
Latte Pastorizzato Pasteurized milk	R	1-2	173.83 (6.01)	158.36 (4.51)
	F	1-2	182.85 (6.47)	159.62 (7.24)
Latte Crudo Raw milk	R	1-2	6279.50 (78.24)	3894.44 (324.17)
	F	1-2	6297.88 (163.14)	3841.38 (213.74)

Figura 1 - Retta di regressione per la matrice latte pastorizzato congelato. Laboratorio 1
 Figure 1 - Frozen pasteurized milk samples. Regression line for Laboratory 1

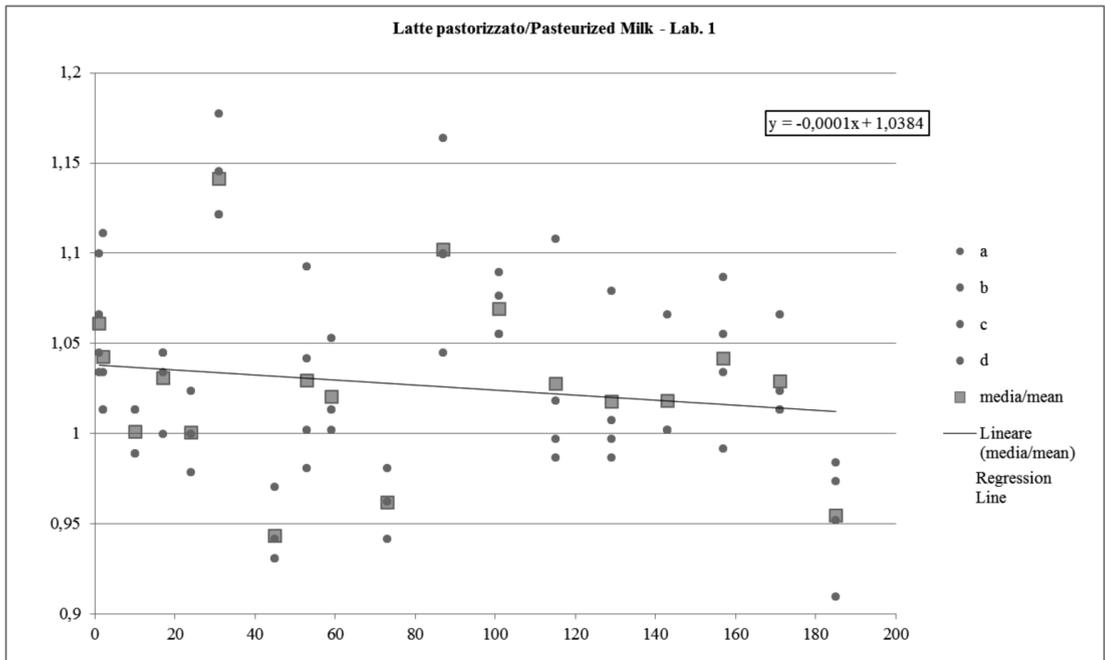


Figura 2 - Retta di regressione per la matrice latte pastorizzato. Laboratorio 2
 Figure 2 - Frozen pasteurized milk samples. Regression line for Laboratory 2

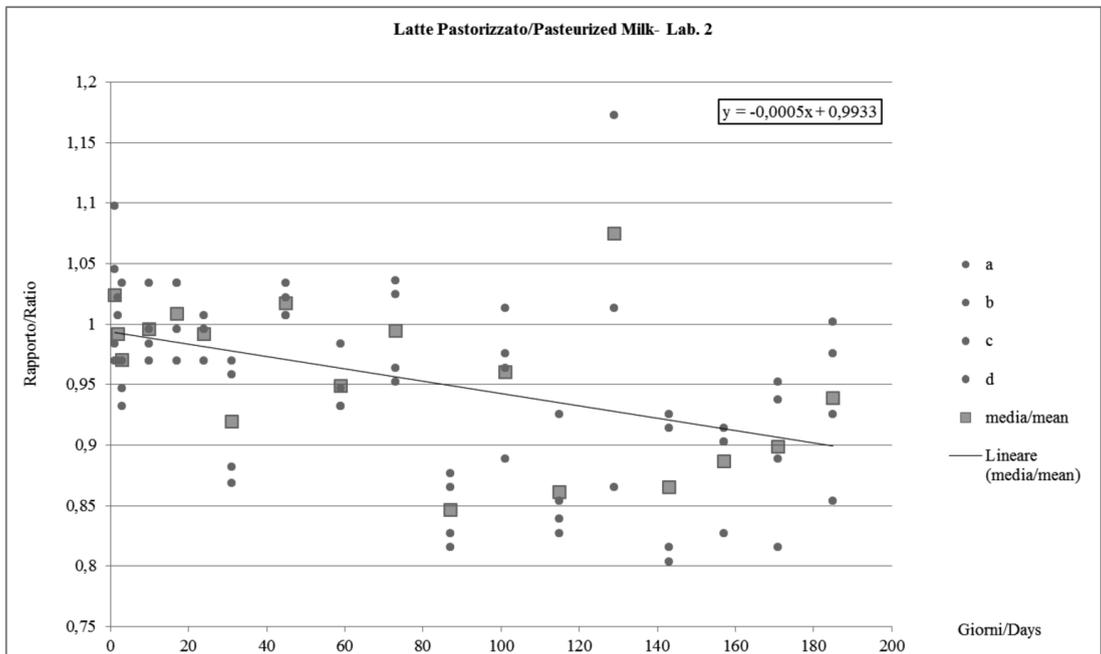


Figura 3 - Retta di regressione per la matrice latte crudo. Laboratorio 1
 Figure 3 - Frozen raw milk samples. Regression line for Laboratory 1

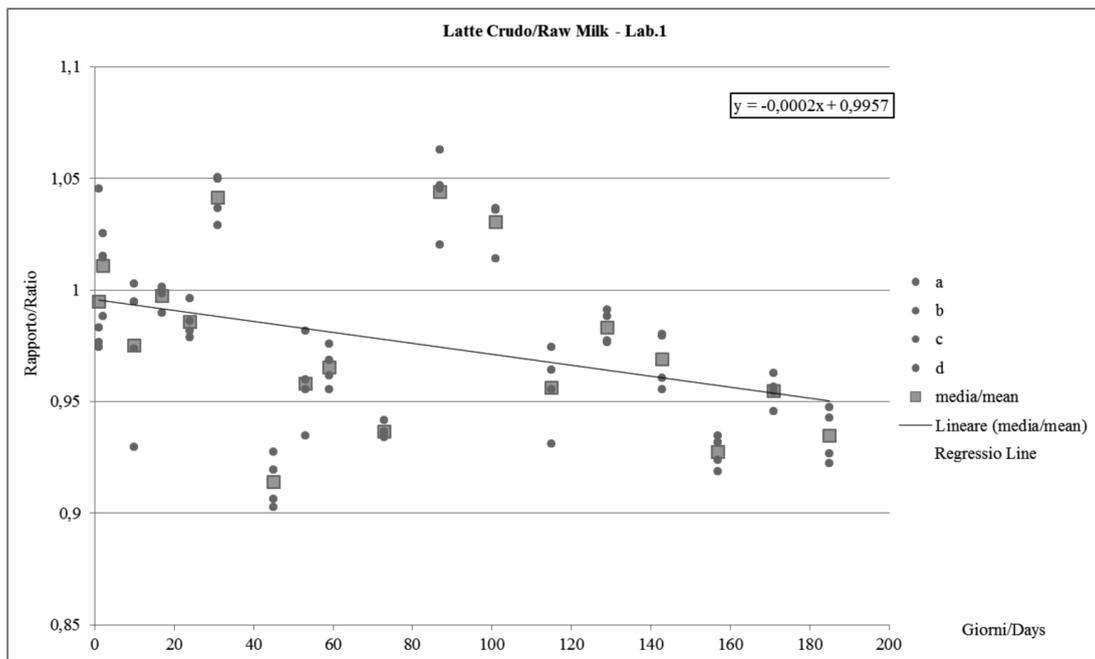
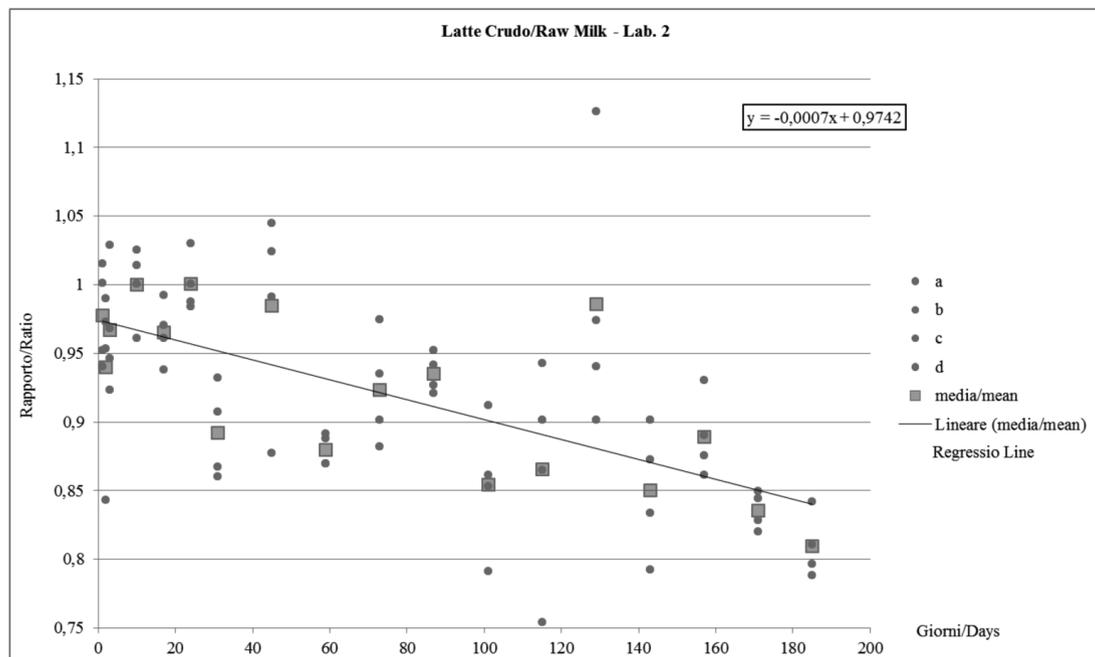


Figura 4 - Retta di regressione per la matrice latte crudo. Laboratorio 2
 Figure 4 - Frozen raw milk samples. Regression line for Laboratory 2



In quest'ottica, i valori osservati per il rapporto tra media Congelato/media Refrigerato, appaiono per lo più di entità decisamente limitata (in media entro il 10 % nel caso del latte pastorizzato). Da tenere presente anche l'effetto che singole sedute analitiche possono avere nel condizionare l'andamento della retta di regressione stimata, in particolare quando ne "contrastano" la tendenza: valori che si scostano fortemente da quelli delle giornate vicine condizionano infatti l'andamento prevalente della regressione. Occasionalmente si sono osservate anche alcune sessioni di analisi con differenze tra le singole aliquote decisamente più elevate rispetto alle restanti, pur tenendo conto dei limiti di ripetibilità analitica (vedi ad esempio in Fig. 2 tra i giorni 120 e 140).

D'altra parte, i controlli di efficienza strumentale condotti dai due Laboratori in ciascuna sessione di prova hanno sempre fornito esiti conformi, i limiti di riproducibilità attesi appaiono sempre rispettati tra le diverse sessioni di prova e, pertanto, abbiamo ritenuto opportuno evitare una selezione dei "dati validi" o presunti "outliers" allo scopo di migliorare il risultato complessivo della stima statistica, con il rischio però di manipolarne l'attendibilità.

Per un'analisi più approfondita delle tendenze graficamente osservate, abbiamo per-

tanto scelto di eseguire un test di significatività per i parametri delle regressioni ottenute, applicato sull'intera base dati.

A questo scopo viene riportata per intero (Tab. 2), la caratterizzazione dell'analisi della varianza applicata, in questo caso sui valori medi del campione di latte pastorizzato del Laboratorio 1, finalizzata a valutare la significatività dei coefficienti della retta di regressione stimata.

In questo caso risulta confermata (valori Coefficienti di Intercetta e Slope/Giorno ed limiti fiduciali 95%) la non significatività statistica del decremento dei valori analitici rappresentati dalla retta di regressione.

Risultano invece significativi i decrementi osservati negli altri 3 casi (Tab. 3, 4 e 5: latte pastorizzato per il solo Laboratorio 2 e latte crudo per entrambi).

Indipendentemente dall'entità dei decrementi osservati (decisamente limitati nel caso del pastorizzato e meno rilevanti nel laboratorio 1 rispetto al 2 nel caso del latte crudo) è possibile ipotizzare che la significatività della riduzione nel contenuto di fosfati dei campioni congelati presenti un trend correlato al tempo intercorso. In effetti applicando il medesimo test di significatività su periodi di tempo più limitati si osserva che, per il campione pastorizzato del Laboratorio 2, la significatività del decremento

Tabella 2 - Analisi della varianza e coefficienti di regressione della matrice latte pastorizzato congelato. Laboratorio 1

Table 2 - Anova and regression coefficient for frozen pasteurized milk. Laboratory 1

Statistica della regressione/Regression statistics	
R multiplo/multiple R	0,1769
R al quadrato/ R squared	0,0313
R al quadrato corretto/ R squared correct	-0,0292
Errore standard/ Standard Error	0,0493
Osservazioni/ Observations	18

ANOVA	gdl	SQ	MQ	F	Significatività F/ F Test
Regressione/ Regression	1	0,00125	0,0012	0,51691	0,48252
Residuo/ Residual	16	0,03887	0,0024		
Totale/ Total	17	0,04012			

	Coefficienti Coefficients	Errore standard Standard Error	Stat t t stat	Valore di significatività Significance Value	Inferiore 95,0% Lower 95%	Superiore 95,0% Upper 95%
Intercetta/ Bias	1,0384	0,0192	53,877	1,60517E-19	0,9975	1,07923
Pendenza/ Slope	-0,0001	0,0001	-0,718	0,48252	-0,0005	0,00027

comparare soltanto nelle analisi eseguite dal 146° giorno in poi (vedi Tab. 6)

Per quanto riguarda il latte crudo, la stessa stima mostra un passaggio alla significatività del decremento a partire dal 171° giorno per il Laboratorio 1 e dal 87° giorno per il Laboratorio 2. Anche con la sola valutazione grafica dei risultati ottenuti appare del resto evidente la maggior pendenza delle rette di regressione del latte crudo rispetto

al pastorizzato e del Laboratorio 2 rispetto al Laboratorio 1.

L'insieme di queste considerazioni ci consente quindi di concludere che, assumendo un limite temporale "prudenziale" e ridotto rispetto alla prova realizzata, è possibile fornire una garanzia statisticamente sostenibile della tenuta dei campioni di latte conservati a -18 °C, indipendentemente dal laboratorio che esegue le analisi e dal livello

Tabella 3 - Coefficiente di regressione della matrice latte pastorizzato congelato. Laboratorio 2
Table 3 - Regression coefficient for frozen pasteurized milk. Laboratory 2

	Coefficienti Coefficients	Errore standard Standard Error	Inferiore 95% Lower 95%	Superiore 95% Upper 95%
Intercetta/Bias	0,993326582	0,021455529	0,947842893	1,038810271
Pendenza/Slope	-0,00050709	0,000221444	-0,000976535	-3,76535E-05

Tabella 4 - Coefficiente di regressione della matrice latte crudo congelato. Laboratorio 1
Table 4 - Regression coefficient for frozen raw milk. Laboratory 1

	Coefficienti Coefficients	Errore standard Standard error	Inferiore 95% Lower 95%	Superiore 95% Upper 95%
Intercetta/Bias	0,995693609	0,014208783	0,9655723	1,025814883
Pendenza/Slope	-0,00024418	0,00014545	-0,000553	6,41615E-05

Tabella 5 - Coefficiente di regressione della matrice latte crudo congelato. Laboratorio 2
Table 5 - Regression coefficient for frozen raw milk. Laboratory 2

	Coefficienti Coefficients	Errore standard Standard error	Inferiore 95% Lower 95%	Superiore 95% Upper 95%
Intercetta/Bias	0,974214334	0,015928247	0,940448	1,007980708
Pendenza/Slope	-0,00072467	0,000164397	-0,001073	-0,00037616

Tabella 6 - Coefficiente di regressione della matrice latte pastorizzato Laboratorio 2: entro 146 giorni
Table 6 - Regression coefficient for frozen pasteurized milk (observation period 146 dd). Laboratory 2

	Coefficienti Coefficients	Errore standard Standard error	Inferiore 95% Lower 95%	Superiore 95% Upper 95%
Intercetta/Bias	0,995456472	0,024849521	0,9417723	1,049140599
Giorno/Day	-0,0005508	0,000338452	-0,001282	0,000180383

di attività fosfataseica iniziale.

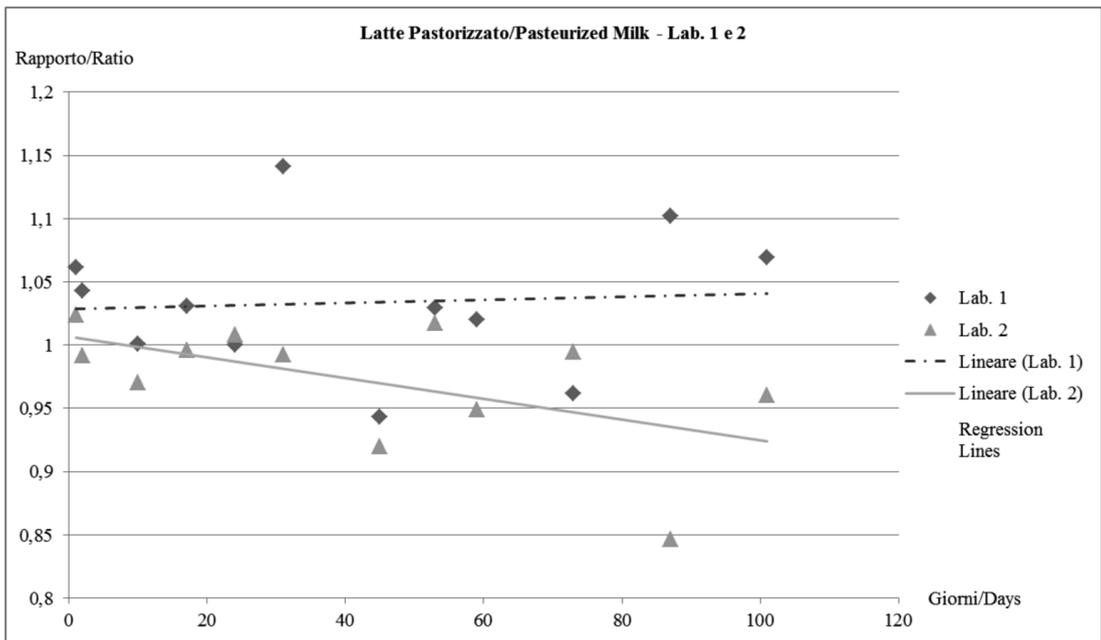
Considerando anche le esigenze pratiche di conservazione a lungo termine dei campioni, riteniamo che un limite temporale di 3 mesi fornisca quindi una solida garanzia di accuratezza analitica rispetto al latte originale. Nei seguenti grafici (Figura 5 e 6) viene pertanto presentata la stima di regressione limitata ai primi 3 mesi di congelamento.

CONCLUSIONI

La prova realizzata ha evidenziato in sintesi che il congelamento protratto per lungo tempo di campioni di latte determina in modo statisticamente significativo un calo dell'attività fosfataseica rispetto al latte di origine sottoposto a refrigerazione per 1-2 giorni. Il decremento è apparso però di ridotta entità, in particolare nel caso del latte pastorizzato, limitato ad uno dei due laboratori; più consistente e confermato in tutti e due i laboratori per il latte crudo.

Considerando che la riduzione dell'attività enzimatica è apparsa divenire significativa soltanto nella seconda fase della prova, a partire dalla 146 giornata di conservazione a -18 °C, e che comunque la sua entità si è mantenuta a livelli complessivamente limitati (10-20 % in media) abbiamo verificato la possibilità di garantire l'accuratezza dell'analisi di campioni congelati per un periodo di tempo inferiore: stimato prudenzialmente in 90 giorni purché ovviamente siano rispettate le modalità ed i tempi usuali di conservazione dei campioni prima del congelamento. Questa conclusione risulta particolarmente robusta se applicata al solo latte pastorizzato nelle condizioni di metodica analitica applicata (che rappresenta del resto la tipologia di campioni maggiormente conferiti per questo tipo di controllo soprattutto nel caso di campionamenti ufficiali). E' comunque da sottolineare che anche periodi di conservazione più prolungati, indipenden-

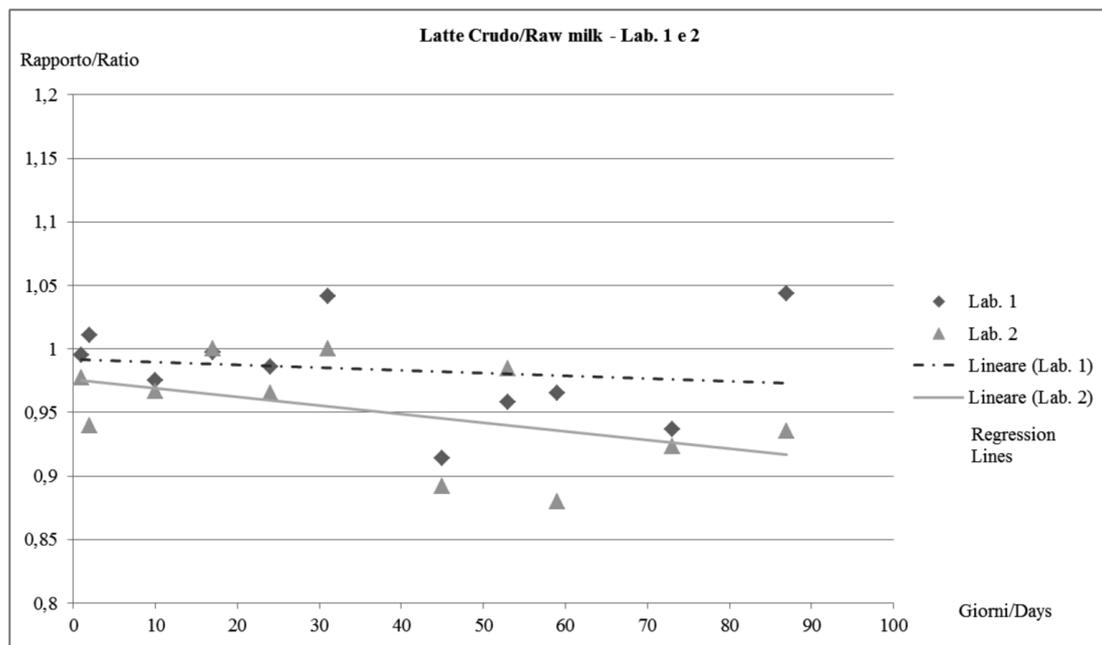
Figura 5 - Retta di regressione matrice latte pastorizzato fino a 90 giorni di conservazione (Lab. 1-2)
Figure 5 - Regression lines for pasteurized milk up to 90 days (Labs 1-2)



temente dal tipo di campione, fornirebbero risultati con sottostime contenute e pertanto gestibili per quanto riguarda l'interpretazio-

ne dell'esito analitico, in particolare se non vi sono valenze legali.

Figura 6 - Retta di regressione matrice latte crudo fino a 90 giorni di conservazione (Lab. 1-2)
Figure 6 - Regression lines for raw milk up to 90 days (Labs 1-2)



BIBLIOGRAFIA

- 1) Legge 30 aprile 1962, n. 283. Modifica degli articoli 242, 243, 247, 250 e 262 del testo unico delle leggi sanitarie, approvato con regio decreto 27 luglio 1934, n. 1265: Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande
- 2) Legge Ordinaria n. 441 del 26/02/1963 (Pubblicata nella G.U. del 11 aprile 1963 n. 98) Modifiche ed integrazioni alla legge 30 aprile 1962, n. 283, sulla disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande ed al decreto del Presidente della Repubblica 11 agosto 1959, n. 750.
- 3) REGOLAMENTO (CE) n. 1664/2006 DELLA COMMISSIONE del 6 novembre 2006 che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda le misure di attuazione per taluni prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che abroga talune misure di attuazione.
- 4) ISO 11816-1:2013 (IDF 155-1) Latte e derivati del latte. Determinazione dell'attività fosfatase. Parte 1: metodo fluorimetrico per il latte e i derivati del latte.

