

Validación del ZymoSnap para la detección de la Fosfatasa Alcalina (ALP) en Productos Lácteos

Introducción

¿Por qué la fosfatasa alcalina?

La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima presente de forma natural en todas las leches crudas. Cataliza la desfosforilación de muchos tipos de proteínas y nucleótidos. Dado que el calor necesario para inactivar la enzima supera al de la mayoría de los microorganismos, incluido el Mycobacterium, sirve como un poderoso indicador del éxito de la pasteurización (junto con el enfriamiento rápido). De hecho, la inactivación de esta enzima hasta un nivel aceptable se utiliza para medir la eficacia de la pasteurización. Este valor varía entre los diferentes tipos de leche pasteurizada: < 350 mU/L para la leche de vaca (Norma ISO 11816-1), < 300 mU/L para la leche de cabra y < 500 mU/L para la leche de oveja. Las mediciones de ALP por encima de estos niveles se considerarían, por tanto, indicativas de un problema significativo en el proceso de pasteurización. Dado que la fosfatasa alcalina es más estable al calor que la mayoría de los organismos patógenos, la fosfatasa alcalina también puede servir como indicador de la seguridad general del producto, aunque no puede garantizar que el producto analizado esté completamente libre de bacterias.

¿Cómo se realiza la prueba de la ALP?

A continuación, se indican dos métodos para el análisis de la ALP: ZymoSnap y Fluorophos® (método de referencia). Este estudio compara el rendimiento de ambos.

ZymoSnap

El ZymoSnap es un método rápido y bioluminogénico que determina el nivel de la enzima ALP a través de la conversión de Unidades Relativas de Luz (RLUs) a miliunidades por litro (mU/L) de ALP en muestras de leche pasteurizada. Un valor inferior a 100 mU/L dará un resultado de Pasa, los resultados superiores a 350 mU/L darán un resultado de Falla. Estos límites se ajustan a la normativa sobre niveles de ALP tras la pasteurización.

El ensayo utiliza un único dispositivo en un procedimiento sencillo. La muestra se añade al tubo ZymoSnap ALP, el dispositivo se activa para liberar el reactivo de detección y se incuba durante 5 minutos. La actividad enzimática ALP resultante se mide en el luminómetro EnSURE® Touch. Para establecer los criterios de Pasa/Falla, se debe preparar un control positivo y uno negativo utilizando el Kit de Control Positivo de ALP ZymoSnap y probarlo antes de analizar las muestras desconocidas.

ZymoSnap está aprobado por la AOAC y está a la espera de la aprobación del NCIMS (National Conference on Interstate Milk Shipments).

Fluorophos

El sistema Fluorophos es un método alternativo que se utiliza para medir la ALP. Este sistema utiliza un fluorómetro, el FLM200, para medir los niveles de ALP en muestras lácteas. El instrumento requiere un espacio considerable junto con un bloque de calentamiento adicional. El sistema requiere un tiempo de 15 minutos para equilibrar la temperatura de funcionamiento. También debe calibrarse diariamente con controles positivos y negativos, y tres calibradores, con la selección del tipo de muestra antes de que se analicen. El sustrato ALP debe prepararse antes de su uso.

El Fluorophos está aprobado por la AOAC, el NCIMS y la ISO, por lo que a menudo se le denomina método de referencia ALP.

Método y Materiales

Equipos, materiales y reactivos

- ZymoSnap ALP (Part No. ZS-ALP-100)
- ZymoSnap ALP Positive Control Kit (Part No. ZS-ALP-PC)
- Incubador/Bloque térmico a 37 ± 1 °C
- Luminómetro EnSURE Touch (Part No. ETOUCH)
- Pipeta y puntas
- Pipeta (10 mL) y tubos de ensayo (0,5" x 4,0")
- Sistema de prueba de Fluorophos - Fluorómetro
- Juego de calibradores de Fluorophos
- Controles de Fluorophos
- Reactivos de prueba de Fluorophos
- Vortex

Preparación de la Muestra e Incubación

ZymoSnap

Una vez que el dispositivo ZymoSnap ALP se haya atemperado, retire el escobillón del dispositivo y añada 75 µl de muestra al tubo. Vuelva a colocar el escobillón en el tubo, agite y mueva el dispositivo para asegurarse de que toda la muestra se deposita en el fondo del tubo. Active el dispositivo doblando el bulbo de la Snap-Valve hacia adelante y hacia atrás para liberar el contenido y apriete el bulbo para liberar el reactivo.

Incube el dispositivo durante $5 \text{ min} \pm 10 \text{ seg.}$ a 37 ± 1 °C. Antes de llegar al final de la incubación, encienda el EnSURE Touch y prepárelo para realizar la lectura. Después de la incubación, agitar el dispositivo ZymoSnap durante 5 segundos para que se homogenice bien.

Coloque inmediatamente el dispositivo en el EnSURE Touch y lea los resultados en mU/L, que representan la actividad ALP.

Fluorophos

Antes de analizar una muestra, el sistema debe calibrarse según la clase de producto que se vaya a analizar (véase más abajo). Además, los reactivos deben prepararse mezclando el sustrato ALP con el tampón de sustrato ALP. Se deben utilizar tres calibradores (A, B y C) para preparar el instrumento antes de realizar la prueba. A continuación, se reconstituyen todos los reactivos y se añade el sustrato a una cubeta de vidrio y se coloca en el bloque de calentamiento. Se pipetea una muestra en la cubeta, se agita en vórtex y se coloca en el fluorómetro. Después de 60 segundos, el fluorómetro comienza a leer la muestra y, al cabo de tres minutos, el fluorómetro mostrará la fluorescencia en mU/L, que representa la actividad de la ALP.

Controles positivo y negativo / Calibración

ZymoSnap

El control negativo se prepara inactivando por calor una muestra similar a la que se va a analizar. Caliente un volumen grande (10 mL) de la muestra en un tubo de ensayo (0,5" x 4,0") en una incubadora o baño de agua a 72 °C durante 10 minutos.

Enfríe la muestra rápidamente en hielo (para evitar la reactivación de la enzima). Este será el Control Negativo. Utilice 1 mL de esta muestra inactivada por el calor para reconstituir los viales de Control Positivo para crear la muestra de control positivo. Nota: esto debe realizarse para cada tipo de muestra.

Para las pruebas de control, se recomienda realizar tres réplicas de cada control positivo y negativo para cada tipo de muestra. Las pruebas se realizan utilizando el mismo procedimiento que para las muestras (detallado anteriormente).

Fluorophos

Los controles del equipo deben prepararse diariamente calentando el control en una cubeta durante 15 minutos en el bloque térmico. A continuación, se coloca el control en el equipo y se registra el valor una vez que la pantalla se estabiliza. A continuación, se hace lo mismo con el sustrato reconstituido (15 minutos en un bloque de calor, y luego se lee la cubeta en el instrumento). Los valores de ambos deben estar dentro de un rango especificado y se registran para su posterior consulta. Una vez completado esto, las muestras pueden ser analizadas como en el caso anterior.

Resultados

Análisis comparativo

Se realizó una comparativa entre ZymoSnap y Fluorophos empleando diez marcas de productos lácteos y tres densidades de sólidos grasos (0,1%, 2% y 4%). Se añadieron a las muestras varios niveles de fosfatasa alcalina bovina (ALP) para comparar el rendimiento del ensayo. Los niveles de adición de ALP utilizados fueron 0, 100 mU/L, 350 mU/L y 1.000 mU/L. Se realizaron cinco réplicas por ensayo con cada muestra. El resultado promedio por muestra se muestra a continuación en la Tabla 1.

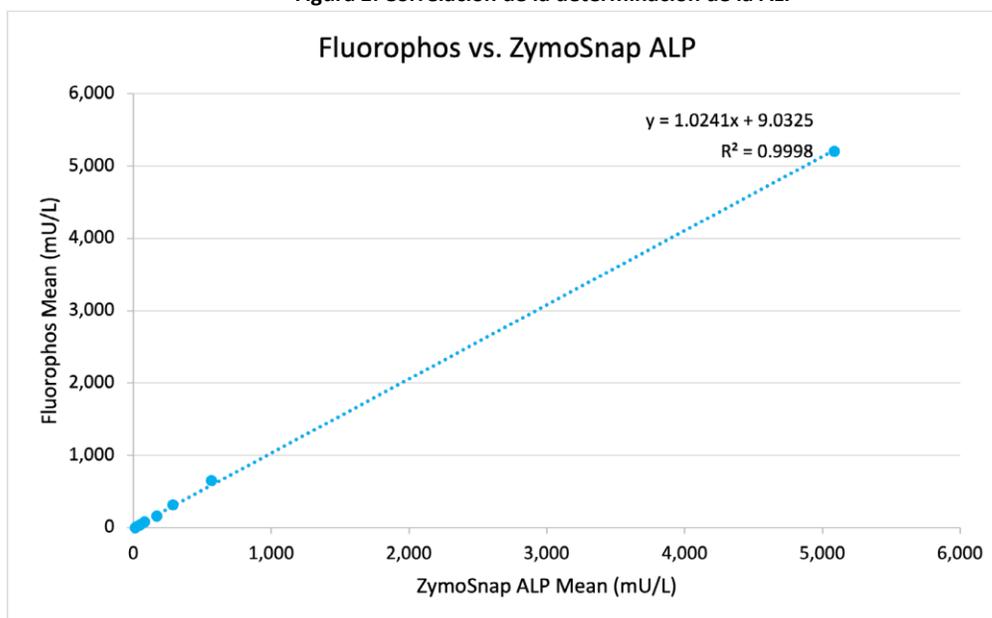
Tabla 1: Comparación de los niveles de ALP en leche de vaca

Tipo de muestra	1,000 mU/L		350 mU/L		100 mU/L		0 mU/L	
	Fluorophos	ZymoSnap	Fluorophos	ZymoSnap	Fluorophos	ZymoSnap	Fluorophos	ZymoSnap
4.0% Leche de vaca	2,462	2,997	377	395	82	66	<10	11
2.0% Leche de vaca	2,253	3,473	228	295	73	96	<10	10
0.1% Leche de vaca	2,136	6,470	167	561	41	182	<10	9

Análisis de precisión y linealidad

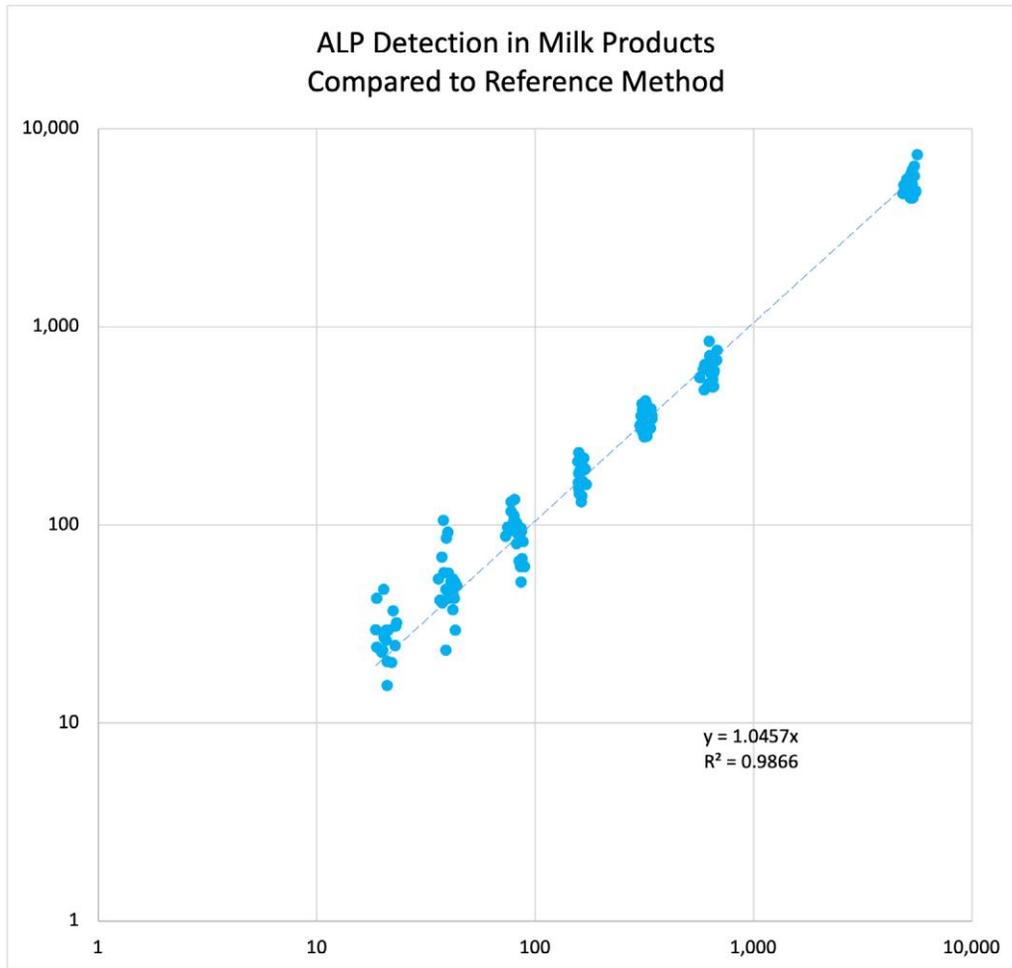
Para verificar la linealidad del ensayo en comparación con el método de referencia (Fluorophos), se analizaron muestras en las que se introdujo ALP a niveles de contaminación de 5.000, 625, 320, 160, 80, 40, 20 y 0 mU/L por triplicado. Se representaron gráficamente los datos de correlación (Figura 1) y se determinó la pendiente de la línea junto con el coeficiente de determinación. El R² resultó ser de 0,9998, lo que demuestra una correlación extremadamente precisa entre ambos métodos.

Figura 1: Correlación de la determinación de la ALP



Se obtuvieron resultados similares cuando se probaron estos niveles de contaminación de ALP en una variedad de productos lácteos, incluida la leche de vaca (con diferentes niveles de grasa del 0,1% al 4%), la nata (20%, 40%), batido de chocolate (0,1%) y batido de fresa. Los resultados se muestran en la Figura 2, manifestando de nuevo una correlación muy estrecha entre Fluorophos y ZymoSnap.

Figura 2: Correlación entre Fluorophos y ZymoSnap de los niveles de ALP en la leche



Otras leches de origen animal

ZymoSnap ha sido probado en otras leches además de la de vaca. Se obtuvo un rendimiento similar al probar la leche de oveja y de cabra, demostrando además que ZymoSnap era apto para su uso en múltiples tipos de leche.

(No se muestran datos)

Conclusiones

Rendimiento

Cuando se compararon ambos sistemas, ZymoSnap funcionó tan bien como Fluorophos en la detección precisa de ALP en productos lácteos. La detección fue lineal y se mantuvo en línea con cada dilución de ALP probada. Los resultados muestran claramente que ZymoSnap ALP puede utilizarse indistintamente con el método de referencia para la detección de ALP en una variedad de leches, incluyendo leches y cremas aromatizadas.

Ventajas adicionales

Además del rendimiento, ZymoSnap ALP ofrece numerosas ventajas en relación con el método de referencia. En primer lugar, ZymoSnap no requiere la necesidad de tener un equipo permanente en el laboratorio ocupando espacio. En segundo lugar, ZymoSnap ALP es un dispositivo sencillo, todo en uno, sin necesidad de añadir o reconstituir otros reactivos. Una vez añadida la muestra, la activación es sencilla y la incubación se produce directamente en el dispositivo. La obtención del resultado también se realiza con el mismo dispositivo. Simplemente se inserta en el luminómetro portátil EnSURE Touch, donde los resultados se muestran en 10 segundos. Además, los datos se almacenan en el dispositivo y/o en la nube (SureTrend® Cloud) para su posterior acceso para el análisis o la determinación de tendencias.

También se pueden almacenar otros datos de pruebas. Por ejemplo, la monitorización medioambiental de la planta puede realizarse mediante dispositivos UltraSnap®, SuperSnap® o AquaSnap® que utilizan métodos similares y rápidos con resultados fáciles de interpretar. La instalación también puede realizar pruebas de organismos indicadores utilizando dispositivos MicroSnap®; estos datos también pueden almacenarse en el mismo sistema basado en la nube.

Recomendación

En general, ZymoSnap ALP tiene un rendimiento equivalente al del método de referencia. Debido a su facilidad de uso, a la rapidez con que se obtienen los resultados y a la capacidad de almacenar los resultados de otras instalaciones en el mismo sistema, cualquier instalación debería ver mejorado el tiempo de respuesta, reducir los costes y simplificar los flujos de trabajo. Por estas razones, ZymoSnap debería ser la mejor opción preferida.

Fluorophos® es una marca registrada de Advanced Instruments, Inc.