


aoxlab	Procedimiento para la determinación antifraude en leche bovina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-072
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

Procedimiento para la determinación antifraude en leche bovina


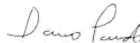
AOXLAB S.A.S.

	Procedimiento para la determinación antifraude en leche bovina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-072
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-072 Determinación antifraude en leche bovina

Copia controlada No. : 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Yeris M. Rinaldy Mojica	Analista de microbiología		2023-02-14
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Directora Calidad		2023-02-14
Aprobó:	Dario Pardo Pardo	Director Técnico		2023-02-14
Localización del documento:		http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/		


Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2018-01-19	1	Ninguno (versión original).	LVLS	YELP	YELP
Vigente	2023-02-14	2	Se cambia estilo según manual identidad	YMRM	APPP	DPP

	Procedimiento para la determinación antifraude en leche bovina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-072
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

ÍNDICE

Sección	Página
1. OBJETIVO Y ALCANCE.	4
1.1 Objetivo.	4
1.2 Alcance.	4
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.	4
2.1 Definiciones.	4
2.2 Notaciones.	4
3. REFERENCIAS.	5
4. PATRONES DE MEDIDA.	5
5. INSPECCIÓN VISUAL.	5
5.1 Revisión general.	5
5.2 Estabilización.	6
5.3 Verificación de patrones y otros equipos.	6
5.4 Manejo del ítem.	6
5.5 Medidas de seguridad.	6
5.6 Preparación de reactivos	7
6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.	7
6.1 Preparación de la muestra	8
6.2 Montaje ELISA	8
6.3 Interpretación de los resultados	9
7. INFORME.	9
8. RESPONSABILIDADES.	9
8.1 Líder de Calidad.	9
8.2 Líder de Laboratorio.	9
8.3 Analistas.	9
9. FORMATOS RELACIONADOS.	10
10. ANEXOS.	10

	Procedimiento para la determinación antifraude en leche bovina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-072
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Determinar adulteración en leche bovina con Suero de cuajo bovino (BRWp) empleando el Kit Milk Fraud/Bovine Rennet Whey ELISA de Europroxima.

1.2 Alcance.

Aplica para el personal técnico del Laboratorio.

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

Calibración [3].

Operación que, bajo condiciones especificadas, en un primer paso, establece una relación entre los valores de las magnitudes con su incertidumbre de medición provista por patrones de medición y las indicaciones correspondientes con incertidumbres de medición asociadas y, en segundo paso, usa esta información para establecer una relación para obtener un resultado de medición de una indicación.

Documento [2].

Información y su medio de soporte.

Ensayo/prueba [2].

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

Procedimiento [2].

Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso.

Suero de cuajo bovino (BRW) [6].

Subproducto de la producción de queso de leche bovina (vaca y búfalo) que contiene glicomacropéptido (GMP), también llamado casein glicomacropéptido (CMP), que es liberado de la kappa-caseína bovina por hidrólisis enzimática (cuajo) durante el proceso de fabricación de queso.

2.2 Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:


“Laboratorio”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.

“Servicios”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

“Ítem”: se refiere a los objetos o materiales bajo ensayo.

3. REFERENCIAS.

[1] ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

	Procedimiento para la determinación antifraude en leche bovina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-072
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

[2] ISO 9000:2015 Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary/ Sistemas de gestión de la calidad-- Fundamentos y vocabulario.

[3] VIM: 2008, International vocabulary of metrology -- Basic and general concepts and associated terms.

[4] ISO/IEC 17000:2004 Conformity assessment -- Vocabulary and general principles.

[5] ISO/TR 10013:2001 Guidelines for quality management system documentation.

[6] Inserto Kit Milk Fraud/Bovine Rennet Whey ELISA de Europroxima.

4. PATRONES DE MEDIDA.

Para realizar el ensayo se utilizan las siguientes soluciones estándar.

No.	Marca	Concentración
0	Europroxima	0
1	Europroxima	0,10
2	Europroxima	0,25
3	Europroxima	0,50
4	Europroxima	1,00
5	Europroxima	2,50

5. INSPECCIÓN VISUAL.


5.1 Revisión general.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se recibe en condiciones normales de operación y presentación física; y detectar cualquier anomalía en su recepción. Esta revisión es realizada conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio

5.2 Estabilización.

Una vez revisado la muestra, se aplican las siguientes instrucciones:

Los patrones de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo y el ítem se mantienen en el lugar de ensayo, y el espectrofluorimetro encendido, por lo menos una hora antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica. Se registra la hora de inicio y fin de esta estabilización.

	Procedimiento para la determinación antifraude en leche bovina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-072
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

Verificar y registrar en los formatos SOFT-TC-001 "Formato carta de control para humedad" y SOFT-TC-002 "Formato carta de control para temperatura ambiente" que las condiciones ambientales de afectación en el servicio se cumplan durante el ensayo del ítem:

Condición ambiental	Mínima	Máxima	Observación
Temperatura ambiente	19,00	27,00	
Humedad relativa	35,00	65,00	

Estas condiciones ambientales fueron identificadas con un efecto en el servicio realizado y sus límites permisibles fueron definidos en base a de los propios patrones del laboratorio, recomendaciones de normas aplicables y servicios realizados.

5.3 Verificación de patrones y otros equipos.

A fin de confirmar que los patrones de referencia a utilizar en el ensayo se encuentran en condiciones adecuadas para realizar el servicio, se realiza una verificación intermedia de acuerdo con el PROC-TC-005 "Procedimiento de verificaciones intermedias de equipo"

5.4 Manejo del ítem.

Para la configuración y operación del ítem, se siguen las instrucciones del manual del fabricante y/o la normativa vigente.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y preparación del ítem se siguen las siguientes instrucciones del procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

5.5 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las medidas de seguridad durante la realización del servicio las cuales puede encontrar en el procedimiento PROC-GC-015 Procedimiento estándar de Bioseguridad.


Verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio"

5.6 Preparación de reactivos

Antes de comenzar la prueba, los reactivos deben estar a la temperatura ambiente.

Cualquier reactivo no utilizado debe volver a almacenarse inmediatamente entre 2 ° C y 8 ° C.

- Placa de microtitulación**
Devuelva las tiras sin usar en la bolsa con cierre con desecante y almacene entre 2 ° C y 8 ° C. para uso en ensayos posteriores. Conservar también el soporte de la tira.
- Tampón de dilución** (Listo para usar, capítulo 5, n.º 9) Para la dilución del conjugado concentrado. Almacenar a 4 ° C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- Tampón de dilución de muestra** (listo para usar, capítulo 5, n.º 1)

	Procedimiento para la determinación antifraude en leche bovina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-072
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

El tampón de dilución de muestra para la dilución de las muestras. almacenar a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.

- **Buffer SEB** (Listo para usar, capítulo 5, n.º 8, 10, 11)
El tampón SEB tiende a precipitar a 4 °C. Asegúrese de que este vial esté en la habitación a temperatura y mezcle bien el contenido antes de usarlo. Si los cristales son visibles, disuelva colocando el tampón en un baño de agua a 37 °C. Almacene el buffer no usado a temperatura ambiente.
- **Tampón A** (15x concentrado, capítulo 5, n.º 12) Diluir el tampón A 15x con agua destilada (1 ml de tampón + 14 ml de agua destilada). Almacene el tampón diluido no usado a temperatura ambiente.
- **Conjugado** El conjugado es 100x concentrado. Gire hacia abajo el conjugado en el vial por un corto paso de centrifugación (1 minuto, 1000 g). Asegúrese de que no quede conjugado en el vial. Añadir 10 µl de la solución de conjugado concentrado a 990 µl de tampón de dilución (capítulo 5, n.º 19). Por 2 x 8 pocillos se requieren 800 µl de conjugado diluido. Almacene el conjugado concentrado no usado a una temperatura de 2 °C a 8 °C.
- **Buffer de enjuague.** El buffer de enjuague es 20x concentrado. Prepare una nueva dilución antes de usar. Para cada tira Se utilizan 40 ml de tampón de enjuague diluido (2 ml de tampón de enjuague concentrado + 38 ml agua destilada). Almacenar a 4 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- **Sustrato / solución de cromógeno.** La solución sustrato / cromógeno (lista para usar) tiende a precipitar a 4 °C. Asegúrese de que este vial esté a temperatura ambiente antes de usarlo (manténgalo en la oscuridad) y mezcle contenido antes de pipetear en los pozos. Almacenar a 4 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.

6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

6.1 Preparación de la muestra


Leche bovina

Leche en polvo: prepare "leche" Agregue 1 g de leche en polvo a 9 ml de agua destilada

- Homogeneizar la muestra
- Pipetee 2 ml de la leche homogeneizada en un tubo (10 ml), agregue 3.8 ml de
- buffer A (capítulo 5, n.º 12) y vortex durante 30 segundos
- Agregue 1.2 ml de 50% de TCA a la muestra y vortex inmediatamente durante 30 segundos
- Centrifugar a 2000 x g durante 10 minutos
- Filtrar a través de un filtro de jeringa (0,45 µm)
- Diluir el filtrado 10x en tampón SEB (100 µl + 900 µl), vortex
- Diluir 1: 1 con tampón de dilución de muestra (capítulo 5, n.º 1) (200 µl + 200 µl), vortex
- Se utiliza una alícuota de 50 µl en la prueba ELISA.

Leche de otras especies (por ejemplo, ovejas o cabras) y fuentes (soja):

- Homogeneizar la muestra
- Pipetee 10 µl de muestra en 990 µl de tampón de dilución de muestras (capítulo 5, n.º 1) (1: 100)

	Procedimiento para la determinación antifraude en leche bovina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-072
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

- dilución), vértice
- Se utiliza una alícuota de 50 µl en la prueba ELISA.
- Si la concentración de kappa-caseína medida excede de 2,5 µg / ml, una nueva dilución en tampón de dilución de muestra (n. ° 1).
- Diluir una vez más 1:10 con tampón de dilución de muestra (dilución 1: 1000), vértice
- Se utiliza una alícuota de 50 µl en la prueba ELISA.

6.2 Montaje ELISA


- Prepare las muestras de acuerdo con el numeral 6.1 (Preparación de la muestra)
- Prepare reactivos de acuerdo con el 5.6 (Preparación de reactivos).
- Pipetee 100 µl del estándar cero por duplicado (pocillos G1, G2, espacios en blanco).
- Pipetee 50 µl del estándar cero por duplicado (pocillos A1, A2, señal máxima).
- Pipetee 50 µl de cada una de las soluciones estándar por duplicado (pocillos B1,2 a F1,2, es decir 0,10, 0,25, 0,50, 1,00 y 2,50 µg / ml).
- Pipetee 50 µl de solución de muestra por cada duplicado en los pocillos restantes de la placa de microtitulación (41 muestras, 82 pocillos).
- Pipetee 50 µl de conjugado (dilución, 5.6) en todos los pocillos, excepto los espacios en blanco G1 y G2.
- Selle la placa de microtitulación y agite durante unos segundos
- Incubar durante 1 hora en la oscuridad a 20 ° C a 25 ° C.
- Descartar la solución de la placa de microtitulación y lavar tres veces con Rinsing buffer (5.6)
- Pipetee 100 µl de sustrato en cada pozo
- Incubar 30 minutos a 20 ° C a 25 ° C.
- Pipetee 100 µl de solución stop a cada pozo
- Leer los valores de absorbancia inmediatamente a 450 nm

6.3 Interpretación de resultados

- **Leche bovina**
 Los porcentajes de BRWp en las muestras de leche bovina se pueden calcular de la siguiente manera:

$$\% \text{ BRWp} = \text{Concentración de } \kappa\text{-caseína (} \mu\text{g / ml)} \times 1.7 *$$
 Rango de medición de 0.2 a 4.25% BRWp.
 Nota II: Debido a las diferencias en las concentraciones de kappa-caseína en diferentes BRW polvos, los porcentajes calculados de BRWp son solo indicativos.
- **Leche de otras especies (por ejemplo, ovejas o cabras) y fuentes (por ejemplo, soja)**
 Los porcentajes de BRWp en las muestras de leche se pueden calcular de la siguiente manera:
 (1: 100) muestras diluidas: $\% \text{ BRWp} = \text{concentración de } \kappa\text{-caseína (} \mu\text{g / ml)} \times 0,3 *$
 Rango de medición de 0.03 a 0.75% BRWp.
 (1: 1000) muestras diluidas: $\% \text{ BRWp} = \text{concentración de } \kappa\text{-caseína (} \mu\text{g / ml)} \times 3 *$

 Rango de medición de 0.3 a 7.5% BRWp

	Procedimiento para la determinación antifraude en leche bovina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-072
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

* Explicación de los factores de multiplicación:

El factor de multiplicación se calculó en 1.7 para muestras de leche bovina.

Los factores de multiplicación se calcularon en 0,3 (1: 100 muestras diluidas) y 3 (1: 1000 muestras diluidas) para leche de otras especies y fuentes.

Los factores de multiplicación pueden establecerse fácilmente después de analizar la leche enriquecida

Para muestras de leche diluida 1: 100 de otras especies y fuentes, se recomienda pico con 0,2% BRWp y para muestras de leche diluida 1: 1000 se recomienda pico con 2% BRWp

Para muestras de leche bovina, se recomienda aumentar con 1% de BRWp.

Los factores de multiplicación se pueden calcular de la siguiente manera:

$$\frac{\% \text{ BRWp spiked (0.2 or 2 or 1)}}{\text{measured } k - \text{casein concentration } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right)} = \text{multiplication factor (mf)}$$

7. INFORME

Los resultados se analizan de la siguiente manera:

Después de leer las absorbancias se ingresan los datos en el formato FOR-TC-064 Formato para el registro de datos del ensayo de antifraude en leche y este permite determinar el % BRWp.

La incertidumbre de las mediciones realizadas se determina conforme el procedimiento PROC-TC-002 Procedimiento de estimación de incertidumbres.

Los resultados se presentan conforme el formato FOR-TC-011 Formato de informe de ensayo.

8. RESPONSABILIDADES.

8.1 Líder de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

8.2 Líder de Laboratorio.

Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.


8.3 Analista.

Aplicar el presente documento.

9. FORMATOS RELACIONADOS.

FOR-TC-011 "Formato de informe de ensayo".

FOR-TC-064 "Formato para el registro de datos del ensayo de antifraude en leche"

	Procedimiento para la determinación antifraude en leche bovina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-072
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

SOFT-TC-001 "Formato carta de control para la humedad"

SOFT-TC-002 "Formato carta de control para la temperatura ambiente"

FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio"

10. ANEXOS.

Milk Fraud/ Bovine Rennet Whey ELISA