


aoxlab	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

Procedimiento para la determinación de Aflatoxinas Totales




AOXLAB S.A.S.


	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

DOCUMENTO CONTROLADO

PROC-TC-087 Procedimiento para la determinación de Aflatoxinas totales


Copia controlada No. : 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Darío Pardo Pardo	Líder Calidad		2023-05-16
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Directora de Calidad		2023-05-18
Aprobó:	Darío Pardo Pardo	Director Técnico		2023-05-18
Localización del documento:		http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig		

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18


Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2018-01-10	1	Ninguno (versión original).	WFR	NBR	YELP
Obsoleto	2020-08-27	2	Se corrigió la referencia al método normalizado	DPP	YELP	YELP
Obsoleto	2021-03-01	3	Se modifica el alcance del ensayo. Se modifican el logo y los colores	DPP	YELP	YELP
Obsoleto	2021-04-28	4	Se documentan los criterios para la actualización de la calibración instrumental	DPP	YELP	YELP
Vigente	2023-05-18	5	Se corrige la referencia bibliográfica del documento normativo Se ajusta el informe al formato para elaboración de documentos	DPP	APPP	DPP

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

ÍNDICE

1.	OBJETIVO Y ALCANCE.....	5
1.1	Objetivo.....	5
1.2	Alcance.	5
2.	DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	6
2.1	Definiciones.....	6
2.2	Notaciones.....	6
3.	REFERENCIAS.....	7
4.	DESARROLLO	8
4.1	PATRONES DE MEDIDA.....	8
4.2	CONDICIONES GENERALES.....	8
4.2.1	Revisión genral.....	8
4.2.3	Verificación de equipos.....	9
4.2.4	Manejo de la muestra.....	9
4.2.5	Medidas de seguridad.....	10
4.3	INSTRUCCIONES DE ENSAYO.....	10
4.3.1	Reactivos no incluidos en el Kit.....	10
4.3.2	Preparación de la muestra.....	10
4.3.3	Implementación del ensayo	10
4.3.4	Procedimiento de ensayo	11
4.4	INFORME	13
5.	RESPONSABILIDADES.....	14
5.1	Director técnico.....	14
5.2	Director de Calidad.....	14
5.3	Líder de Laboratorio.....	14
5.4	Analista.....	14
6.	FORMATOS RELACIONADOS.....	15
7.	ANEXOS.....	15

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.


Describir los pasos para realizar el ensayo de análisis de aflatoxinas totales conforme los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [1].

1.2 Alcance.

El personal técnico del laboratorio debe conocer este documento.

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método	Rango de medición
Determinación de Aflatoxinas Totales como la suma de: Aflatoxina B ₁ , Aflatoxina B ₂ , aflatoxina G ₁ y aflatoxina G ₂	AOAC 993.16 (2023) [5]	Inmunoensayo enzimático cuantitativo	1.72 mg/Kg – 4.05 mg/Kg

El método es aplicable a las matrices vegetales/maíz.

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

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 [3].

Información y su medio de soporte.

Ensayo/prueba [3].

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

Procedimiento [3].

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

Aflatoxinas Totales [4]

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios de las especies de hongos *Aspergillus falvus*, *parasiticus* y *nomius*. Estos hongos crecen en áreas tropicales húmedas y la contaminación de alimentos vegetales tiene lugar en los países cultivables. Las aflatoxinas pertenecen a las sustancias cancerígenas naturales más fuertes.

Aflatoxina B1 se encuentra principalmente junto con las aflatoxinas B2. G1 y G2 es el que tiene la mayor importancia tóxica. Se encuentra sobre todo en maíz, cacahuetes, Brasil, nueces, semillas de algodón y pistachos.

Dependiendo de la toxicidad de estas micotoxinas en los países de la UE, los límites iguales son válidos para las aflatoxinas, 2 ug/Kg para la aflatoxina B1 y 4 ug/Kg para todas las aflatoxinas en total en los cereales.


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.

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

3. REFERENCIAS.

- [1] International Organization for Standardization. (2023). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (ISO Standard No. 17025:2017). ISO/IEC 17025:2017.
- [2] Biotek Software GEN 5 V2.0 y RIDA®SOFT
- [3] International Organization for Standardization. (2023). Quality management systems - Fundamentals and vocabulary (ISO Standard No. 9000:2015)
- [4] RIDASCREEN Aflatoxin Total (Art. No: R4701) Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Aflatoxins
- [5] Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2023) 22nd Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 993.16

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

4. DESARROLLO

4.1 PATRONES DE MEDIDA.

Patrones (o materiales), equipos y/o componentes clave
Pipeta de volumen variable de 200 µL
Pipeta Eppendorf de volumen variable de 1000 µL
Espectrofluorimetro capaz de realizar lecturas a 450 nm
Probeta 50 mL

4.2 CONDICIONES GENERALES.

4.2.1 Revisión general.

El kit debe almacenarse a una temperatura entre 2° C y 8° C cuando no se encuentre en uso.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, ésta es inspeccionada con el fin de verificar que las condiciones de cantidad, empaque y preservación se mantienen, conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que se cuenta con mínimo 50 gramos de muestra para realizar este análisis.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, realizar la observación en el FOR-TC- 067 "Formato para el registro de datos primarios de Aflatoxinas Totales", e informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.


4.2.2 Estabilización

Los ítems de ensayo, el kit y controles de calidad deben atemperarse con suficiente antelación de tal manera que se encuentren en equilibrio térmico con el ambiente en el cual se ejecutarán los ensayos.

El cromógeno provisto en el kit es sensible a la luz. Debe permanecer protegido de esta.

Debe verificarse la fecha de expiración del kit.

La balanza analítica y otros equipos electrónicos que realicen mediciones de alguna magnitud correspondiente a condiciones de influencia en la ejecución del ensayo deben encenderse por lo menos media hora antes de su uso. Así mismo, deben verificarse los equipos, de acuerdo con lo establecido en el numeral 4.2.3.

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

4.2.3 Verificación de equipos.

Antes de iniciar el ensayo, debe verificarse que el estado de funcionamiento de los equipos sea adecuado. Esto puede llevarse a cabo revisando que cuenten con la etiqueta de mantenimiento vigente y que estos no tengan alguna etiqueta que lo identifique como "Fuera de servicio". Además, en el caso en el cual se lleve el control de uso, deben registrarse los últimos registros consignados en el formato FOR-TC-017, con el propósito de verificar que no se han registrado fallas en el funcionamiento. Si algún equipo es utilizado para la medición de alguna magnitud de influencia en el ensayo, este debe estar calibrado. Por tanto, se debe verificar la etiqueta de calibración adherida a este, y comprobar que se encuentre vigente.

Así mismo, debe verificarse que se haya realizado y registrado la verificación diaria de la balanza analítica en el formato FOR-TC-005.

Además de lo anterior, debe verificarse la fecha de expiración de los patrones, materiales de referencia y controles de calidad empleados en el ensayo con el fin de evitar el uso de materiales vencidos.


4.2.4 Manejo de la muestra.

Para el almacenamiento de la muestra se debe tener en cuenta que esta debe ser almacenada de forma tal que se prevenga la contaminación cruzada con otros productos que contengan: harina de cereales, centeno y cebada. La identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, deben realizarse de acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

Sí la muestra es líquida, mezclar hasta homogeneidad aparente mediante agitación magnética, y con la ayuda de un gotero o una pipeta tomar la cantidad necesaria de muestra, mientras se continúa con la agitación.

Sí la muestra es sólida, moler o triturar en su totalidad hasta homogeneidad aparente, y realizar un cuarteo atendiendo los siguientes pasos:

- Colocar la muestra previamente homogeneizada sobre una superficie lisa, limpia y seca, donde no existan corrientes de aire fuertes.
- Limpiar los instrumentos a utilizar (espátula o cuchara).
- Mezclar la muestra echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.
- Juntar todo el material dándole forma circular con espesor uniforme.
- Dividir el material en cuatro sectores iguales.
- Eliminar los sectores opuestos quedando la masa del material reducida a la mitad.

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

- Mezclar los dos sectores restantes echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.

4.2.5 Medidas de seguridad.

Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar u omitir ningún paso.

La descontaminación de las soluciones de cristalería y aflatoxina se lleva a cabo mejor uso de una solución de hipoclorito sódico [10 % (v/v)] durante la noche (ajustar la solución con HCl a pH 7).

El ensayo debe realizarse en cabina de extracción.

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC-015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XIII.

Es muy importante limpiar los equipos y las superficies de acuerdo con el PROC-TC-031 en donde se está tratando la muestra para evitar cualquier tipo de contaminación.

4.3 INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

4.3.1 Reactivos no incluidos en el Kit

- Metanol
- Solución de metanol 70%: Tomar 70 mL de metanol G.A y aforar a 100 mL con agua destilada
- Agua destilada


4.3.2 Preparación de la muestra

Una muestra representativa debe ser triturada y homogenizada

- Pese 5 g de la muestra molida en un contenedor apropiado
- Adicione 25 mL de metanol al 70 %
- Agite vigorosamente durante 2 minutos en vortex
- Filtre el extracto a través de un papel de filtro Whatman #1 o centrifugar 10 min a 6500 rpm
- Diluya 100 µL del filtrado con 600 µL de agua destilada.
- Utilice 50 µL del filtrado diluido por pocillo en la prueba.

4.3.3 Implementación del ensayo

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de su uso.

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

Como **tampón de lavado** es necesario un tampón PBS-Tween. Por favor utilice para ello la sal (tampón) adjunta. Para la preparación del tampón se disuelve el contenido completo del sobre en un litro de agua destilada. El tampón disuelto se mantiene estable entre 4 y 6 semanas a una temperatura de 2 a 8 °C (35 - 46 °F).

Alternativa: Disolver el contenido del sobre en 100 ml de agua destilada (10 veces concentrado). La solución es estable de 8 a 12 semanas a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

Para preparar la disolución lista para el ensayo, se mezcla 1 parte del concentrado (de 10 veces) con 9 partes de agua destilada.

La reacción comienza con la adición del anticuerpo específico. Sin embargo, no se deberían utilizar más de tres tiras por test si se trabaja con una pipeta mono canal. Es posible analizar hasta 6 tiras al mismo tiempo utilizando una pipeta repetidora (multistep).

Devuelva todos los reactivos a una temperatura entre 2 - 8 °C inmediatamente después de ser utilizados.

Nota 1: Los estándares de aflatoxina se encuentran listos para su uso. El factor de dilución 10 de las muestras ya fue considerado durante el etiquetado de los estándares, por lo tanto, la concentración de aflatoxina en la muestra puede ser leída directamente de la curva de estándares.


Nota 2: La calibración instrumental debe actualizarse al iniciar un nuevo kit de ensayo o cuando se detecten fallas en el control de calidad atribuibles a la calibración.

Si la concentración de aflatoxina esperada excede los 120 ppm, una dilución exhaustiva debe llevarse a cabo con agua destilada/metanol 10% (9 mL agua destilada + 1 mL de metanol G.A).

4.3.4 Procedimiento de ensayo

Seguir cuidadosamente el procedimiento de lavado. No dejar secar los micropozos entre cada paso del ensayo.

- Coloque suficientes pocillos en el soporte de la microplaca para los estándares y para las muestras a analizar. Marque la posición de los estándares y de las muestras.
- Adicione 50 µl de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes. Utilice una punta de pipeta nueva para cada estándar y para cada muestra.
- Adicione 50 µl del conjugado a cada pozo.

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

- Adicione 50 µl del anticuerpo a cada pozo, mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 - 25 °C), cubriendo la placa de pozos con papel aluminio.
- Verter el líquido contenido en los pozos en un papel absorbente y agitar vigorosamente 3 veces, asegurándose de remover por completo el líquido de los pozos. Llenar los pozos con 250 µL del buffer de lavado diluido y verter el líquido nuevamente sobre papel absorbente. Realizar este procedimiento dos veces más.
- Adicione 100 µl de sustrato/cromógeno (tapón marrón) a cada pozo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F), cubriendo la placa de pozos con papel aluminio.
- Agregue 100 µl de la solución stop (tapón amarillo) a cada pozo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente y mida la absorbancia a 450 nm en el transcurso de los siguientes 30 min.

4.3.5 Lectura

Nota: La calibración instrumental debe actualizarse al iniciar un nuevo kit de ensayo o cuando se detecten fallas en el control de calidad atribuibles a la calibración.

Se inicia el software GEN5 del espectrofluorimetro que se encuentra en el escritorio del computador de espectrofotometría.

Se busca el método de aflatoxinas totales en la carpeta de espectrofotometría siguiendo la siguiente ruta:


L:\LABORATORIO\REGISTROS\REGISTROSRT\Espectrofotometria\PROTOCOLOS DE LECTURA ESPECTROFLUORIMETO

Una vez se encuentra en la carpeta de protocolos buscar PROC-TC-087 Procedimiento Aflatoxinas totales dar doble clic para iniciar el software

Realizar la lectura a 450 nm

Una vez realizada la lectura guardar los resultados de la siguiente forma

ESAA059MMDDLN°
 ES: Espectrofluorimetro
 AA: Año de análisis
 059: Numero de procedimiento
 MM: Mes del análisis
 DD: Día del análisis
 L: Lote
 N°: Número de lote

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

4.4 INFORME

Los resultados se analizan de la siguiente manera:

Registro de datos: Los datos serán registrados en el formato FOR-TC- 067 "Formato para el registro de datos primarios de determinación de aflatoxinas Totales"

Cálculos: Los cálculos son realizados en el software RIDASOFT WIN el cual se encuentra en la siguiente ruta ubicado en el computador de fisicoquímica con ruta de acceso \escritorio\ridasoftwin. Este software es suministrado por los fabricantes del kit con el fin de realizar los cálculos y generar un reporte con los resultados del ensayo los cuales se guardan en la siguiente ruta del computador de fisicoquímica /laboratorio/resultadosridasoftwin

El límite de detección del método es:

Límite de detección correspondiente a los estándares para cereales y alimentos es aproximadamente 1.75 ug/Kg


La diferencia de los experimentos no debe ser superior al 5% del promedio ($\%CV \leq 5$) CV = Coeficiente de variación.

- El resultado promedio obtenido en el software RIDASOFT WIN y su respectiva incertidumbre expresados con dos decimales son ingresados por el analista en el software analítica en el módulo Resultados del área micotoxinas y alérgenos.
- Una vez ingresados estos resultados son revisados por el líder del laboratorio y aprobados por el director técnico. Con la aprobación en el software del resultado el informe es enviado automáticamente al correo registrado por el cliente.
- Los informes y registros generados son tratados de acuerdo con el procedimiento PROC-GC-003 Procedimiento de control de documentos.

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".

Se aplican los siguientes los criterios de cumplimiento, CUMPLE / NO CUMPLE basados en la normativa vigente para cada matriz de alimento (si aplica), de acuerdo con el respaldo técnico dado por las NTC vigentes, Codex Alimentario, Resoluciones INVIMA vigentes.

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

5. RESPONSABILIDADES.

5.1 Director técnico.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

5.2 Director de Calidad.


- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.
- Revisar los resultados obtenidos del aseguramiento de calidad del método.
- Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

5.3 Líder de Laboratorio.

- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.
- Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.
- Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

5.4 Analista.

- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio
- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.

	Procedimiento para la determinación de aflatoxinas totales AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-087
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2023-05-18

- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.

6. FORMATOS RELACIONADOS.

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

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

PROC-TC-002 "Procedimiento de estimación de incertidumbres".

PROC-TC-005 "Procedimiento de verificaciones intermedias de equipo del Laboratorio".

PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

FOR-TC-007 "Formato para el control de calibración, verificación, mantenimiento y limpieza de equipos."

FOR-TC-017 "Formato para el control de uso de equipos."

FOR-TC-067 "Formato para el registro de datos primarios de determinación de aflatoxinas Totales"

SOFT-TC-053 "Cuadro de mando para el ensayo de Aflatoxinas totales 2023-01"

7. ANEXOS.

Inserto (Ridascreen Aflatoxin Total Art. No. R4701)