

	Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-092
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1

AOXLAB S.A.S.

	Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-092
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

DOCUMENTO CONTROLADO

PROC-TC-092 Procedimiento de ensayo determinación de Aflatoxina M1

Copia controlada No. : 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Lorena Correa Restrepo	Líder Laboratorio	<i>LORENA CORREA R</i>	2023-02-14
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Líder de Calidad	<i>AngelaPPP</i>	2023-02-14
Aprobó:	Dario Pardo Pardo	Director Técnico	<i>Dario Pardo</i>	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	2018-01-09	1	Ninguno (versión original).	WFR	NBR	YELP
Vigente	2023-02-14	2	Se cambia estilo según manual identidad	LCR	APPP	DPP

	Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-092
		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.	5
3. REFERENCIAS.	5
4. PATRONES DE MEDIDA.	5
5. INSPECCIÓN VISUAL.	6
5.1 Revisión general.	6
5.2 Estabilización.	6
5.3 Verificación de patrones y otros equipos.	6
5.4 Manejo de la muestra.	7
5.5 Medidas de seguridad.	7
6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.	7
6.1 Preparación de la muestra	7
6.2 Preparación del ensayo	8
6.3 Procedimiento de ensayo	8
7. INFORME.	9
7.1 Registro de datos	10
7.2 Cálculos	10
8. RESPONSABILIDADES.	11
8.1 Director Técnico	11
8.2 Líder de Calidad.	11
8.3 Líder de Laboratorio.	11
8.4 Analistas.	11
9. FORMATOS RELACIONADOS.	11
10. ANEXOS.	12

	Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-092
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

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

1.2 Alcance.

Aplica para el personal técnico del Laboratorio.

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método	Incertidumbre (si aplica)	
Determinación de Aflatoxina M1	Incerto (Ridascreen Aflatoxina M1 Art No: R1121)	Inmunoensayo Enzimático	XX	

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.

Aflatoxina M1 [4]

Las aflatoxinas son productos metabólicos cancerígenos y altamente tóxicos de los hongos del género *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*. La aflatoxina M1 es un producto metabólico producido a partir de la aflatoxina B1. Aflatoxina M1 es segregada por vacas lactoproductoras luego de haber consumido alimentos que contengan aflatoxina B1. La aflatoxina M1 es relativamente estable ante el proceso de

	Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-092
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

pasteurizado por lo tanto no sólo un extenso control de las materias primas es necesario sino también del producto terminado.

Desde el 1 de enero de 1999 están en vigor unitariamente para toda la CE las cantidades máximas de aflatoxinas. En el caso de la aflatoxina M1 la cantidad máxima se fijó en 0,05 µg/l (50 ppt).

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.

“**Item**”: 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.
- [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] RIDASCREEN Aflatoxin M1 (Art. No: R1121) Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Aflatoxin M1

4. PATRONES DE MEDIDA.

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes patrones (o materiales) de referencia, equipos y componentes clave:

No. Inventario	Patrones (o materiales), equipos y/o componentes clave	Marca	Modelo	No. Serie
006 A	Balanza analítica	RADWAG	AS220/C/2	348577/12
016 A	Pipeta Capp KE 11309	CAPP	BRAVO	KE11309
017 A	Pipeta Eppendorf 029341C	EPPENDORF	RESEARCH PLUS	029341C
072 A	Espectrofluorimetro	BIOTEK	SYNERGY HT	1401114

	Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-092
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

003A	Vortex	VELP SCIENTIFICA	VORTEX MIXER CLASSIC	251121
007 A	Centrifuga	EPPENDORF	5430	5427aj213219

5. INSPECCIÓN VISUAL.

5.1 Revisión general.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se garantizan las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

5.2 Estabilización.

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

Los patrones y equipos de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo y la muestra se mantienen en el lugar de ensayo, y encendidos (si es el caso), por lo menos una (1) 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 en el FOR-TC-017 Formato para el control de uso de equipos.

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	25,00	
Humedad relativa	35,00	75,00	

Estas condiciones ambientales fueron identificadas con un efecto en el servicio realizado y sus límites permisibles fueron definidos en base a el respaldo técnico e histórico de las condiciones ambientales permisibles de operación de los ítems que se reciben a ensayo, de los propios patrones y equipos del laboratorio, recomendaciones de normas aplicables y servicios realizados.

5.3 Verificación de equipos.

A fin de confirmar que los equipos 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 del Laboratorio"

	Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-092
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

las cuales son registradas en el FOR-TC-007 Formato para el control de calibración, verificación, mantenimiento y limpieza de equipos.

5.4 Manejo de la muestra.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

5.5 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio: se debe revisar la carpeta de mantenimientos y calibraciones, verificar que el equipo se encuentra en las condiciones adecuadas para su uso de acuerdo a los manuales de operación de cada equipo (ubicados en el módulo 1 del laboratorio) y no requiere alguna intervención, 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".

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

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

6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

El ensayo del ítem se realiza teniendo en cuenta las consideraciones propuestas por la guía del kit RIDASCREEN Aflatoxin M1 (Art. No: R1121)

Antes de iniciar el ensayo verificar que cuenta con los pozos y reactivos suficientes para realizar el ensayo, los reactivos están incluidos dentro del RIDASCREEN Aflatoxin M1 (Art. No: R1121)

Reactivos no incluidos en el kit

- Agua destilada

6.1 Preparación de las Muestras

	Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-092
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

Las muestras deben ser almacenadas en un lugar fresco, protegidas de la luz.

6.1.1 Leche

- Centrifugar la muestra de leche para desengrasar: 10 minutos a 3500g a 10°C (Si no hay refrigeración en la centrifuga, enfriar la muestra a 10°C antes de centrifugar)
- Después de centrifugar, remover la capa superior de crema completamente por aspiración a través de una pipeta Pasteur.
- Usar la leche desnatada (sobrenadante desengrasado) directamente en el ensayo (100µL por pozo)

6.1.2 Leche en Polvo

- Pesar 10 g de leche en polvo en un balón de aforo y llevar a 100 mL con agua desionizada
- Homogenizar por agitación
- Calentar la solución de leche en polvo hasta 50 °C en un baño de agua por 30 minutos
- Continuar con la preparación de la leche como se describe en el numeral 6.1.1

Nota: Si es necesaria una dilución, usar el buffer de dilución de muestra contenido en el kit

6.2 Preparación del ensayo

- Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de su uso.
- Como **tampón de lavado** es necesario un tampón PBS-Tween. Por favor utilice para ello la sal (tampón). 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).

6.3 Procedimiento de ensayo

Tenga en cuenta las siguientes recomendaciones durante el procedimiento de lavado. No deje secar los micropozos entre cada paso del proceso.

	Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-092
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

- 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 100 µl de la solución anticuerpo al fondo de cada pozo. Mezcle suavemente por agitación manual e incube por 15 minutos a temperatura ambiente (20 -25°C)
- Vacíe los pocillos y golpee luego enérgicamente (tres veces consecutivas) el marco microplato sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Lave los pocillos con buffer de lavado (250 µl por pocillo), utilizando una pipeta-multicanal o una botella de lavado y vacíe nuevamente los pocillos de la forma ya indicada. Repita este paso dos veces más.
- Adicione 100 µl del estándar o la muestra ya preparada por separado y por duplicado en cada pozo. Mezcle suavemente por agitación manual e incube por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad
- Vacíe los pocillos y golpee luego enérgicamente (tres veces consecutivas) el marco microplato sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Lave los pocillos con buffer de lavado (250 µl por pocillo), utilizando una pipeta-multicanal o una botella de lavado y vacíe nuevamente los pocillos de la forma ya indicada. Repita este paso dos veces más.
- Adicione 100 µl del conjugado al fondo de cada pozo. Mezcle suavemente por agitación manual e incube por 15 minutos a temperatura ambiente (20 -25°C) en oscuridad.
- Vacíe los pocillos y golpee luego enérgicamente (tres veces consecutivas) el marco del microplato sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Lave los pocillos con buffer de lavado (250 µl por pocillo), utilizando una pipeta-multicanal o una botella de lavado y vacíe nuevamente los pocillos de la forma ya indicada. Repita este paso dos veces más.
- Adicione 100 µl del substrato/cromógeno al fondo de cada pozo. Mezcle suavemente por agitación manual e incube por 15 minutos a temperatura ambiente (20 -25°C) en oscuridad.
- Adicione 100 µl de la solución stop a cada pozo. Mezcle suavemente por agitación manual y lea la absorbancia a 450 nm. Lea dentro de los próximos 15 minutos después de adicionar la solución stop.

7. INFORME

Los resultados se analizan de la siguiente manera:

	Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-092
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

7.1 Registro de datos

Los resultados de la lectura son registrados en software GEN5, donde se genera un reporte con el análisis realizado, la fecha y el numero de muestra.

Los datos serán registrados en el formato FOR-TC- 074 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de Aflatoxina M1"

7.2 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

Tener en cuenta el factor de dilución al momento de realizar el calculo en el software RIDASOFT WIN.

Leche-----1
Leche en polvo (refiriéndose a leche reconstituida) -----1
Leche en polvo (refiriéndose a g-peso) -----10

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.

	Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-092
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

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 al respaldo técnico dado por las NTC vigentes, Codex Alimentario, Resoluciones INVIMA vigentes.

8. RESPONSABILIDADES.

8.1 Director técnico.

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

8.2 Líder de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento

8.3 Líder de Laboratorio.

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

8.4 Analista.

Aplicar el presente documento.

9. FORMATOS RELACIONADOS.

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

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"

SOFT-TC-004 Formato cuadro de mando de análisis fisicoquímicos
PROC-TC-002 "Procedimiento de estimación de incertidumbres".

PROC-GC-003 Procedimiento de control de documentos.

	<p style="text-align: center;"> Procedimiento de ensayo Determinación de Aflatoxina M1 AOXLAB S.A.S </p>	Identificación: PROC-TC-092
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

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- 074 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de Aflatoxinas M1"

10. ANEXOS.

Incerto (Ridascreen Aflatoxina M1 Art No: R1121)