

	Procedimiento de ensayo Determinación de T2-Toxina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-096
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

Procedimiento de ensayo Determinación de T2-Toxina

AOXLAB S.A.S.

	Procedimiento de ensayo Determinación de T2-Toxina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-096
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-096 Procedimiento de ensayo determinación de T2-Toxina

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	Directora de Calidad	<i>Angela PPP</i>	2023-02-14
Aprobó:	Dario Pardo Pardo	Director Técnico	<i>Dario Pardo</i>	2023-02-14
Localización del documento:				


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 T2-Toxina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-096
		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	9
7.2 Cálculos	9
8. RESPONSABILIDADES.	10
8.1 Director Técnico	10
8.2 Líder de Calidad.	10
8.3 Líder de Laboratorio.	10
8.4 Analistas.	11
9. FORMATOS RELACIONADOS.	11
10. ANEXOS.	11

	Procedimiento de ensayo Determinación de T2-Toxina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-096
		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 17025:2005 [1].

1.2 Alcance.

Aplica para el personal técnico del Laboratorio.

Prueba o ensayo	Técnica o Método
Determinación de Zearalenon	Inmunoensayo Enzimático

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.

T2-toxina [4]


La toxina T-2 pertenece al grupo de micotoxinas de los tricoticonos, es producida por el hongo del género *Fusarium* y es comúnmente encontrada en los granos en general, aunque la incidencia y las concentraciones muestran fluctuaciones regionales muy amplias. Debido a su acción citotóxica e inmunosupresora, la toxina T-2 es una amenaza para la salud humana y animal.

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.

	Procedimiento de ensayo Determinación de T2-Toxina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-096
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

“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.
- [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 Fast T2-toxin (Art No: R52302) Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Zearalenon

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	Espectrofluorímetro	BIOTEK	SYNERGY HT	1401114
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”.

	Procedimiento de ensayo Determinación de T2-Toxina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-096
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

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" 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.

	Procedimiento de ensayo Determinación de T2-Toxina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-096
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

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 archivador de fisicoquímica/186) 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 FAST T2-Toxin (Art. No: R5302)

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 FAST T2-Toxin (Art. No: R5302)


Reactivos no incluidos en el kit

- Agua destilada
- Solución Metanol 70%: A 70 mL de etanol grado Analítico adicionarle 30 mL de agua destilada y agitar bien.

6.1 Preparación de las Muestras

Las muestras deben ser almacenadas en un lugar fresco, protegidas de la luz. Una muestra representativa (de acuerdo con la técnica de muestreo aceptada) debe ser molida y mezclada.

- Pese 5 g de la muestra molida en un contenedor apropiado y agréguele 25 ml de metanol al 70 %

	Procedimiento de ensayo Determinación de T2-Toxina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-096
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

Nota: La cantidad de la muestra puede ser aumentada siempre y cuando el volumen de metanol/agua se aumente respetando el factor de dilución dado.

- Agite vigorosamente durante 3 minutos (a mano o utilizando el agitador magnético, respete muy bien los tiempos).
- Filtre el extracto a través de un papel de filtro Whatman # 1 o su equivalente.
- Diluya 1 ml del filtrado con 1 ml de agua destilada o deionizada.
- Utilice 50 µl del filtrado diluido por pocillo en el test.

6.2 Preparación del ensayo

- Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de su uso.
- 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 pipetamonocanal. 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: Los estándares T2-Toxina se encuentran listos para su uso. El factor de dilución 5 de las muestras ya fue considerado durante el etiquetado de los estándares, por lo tanto, la concentración de T2-Toxina en la muestra puede ser leída directamente de la curva de estándares.

6.3 Procedimiento de ensayo

Un lavado exhaustivo es muy importante. No permita que los pocillos se sequen completamente. Evite intervalos prolongados de tiempo entre los pasos de trabajo. La reproducibilidad de los resultados depende en gran parte de un lavado uniforme de los pocillos. Siga cuidadosamente la secuencia de lavado descrita en el procedimiento.

Cubra los pocillos con papel aluminio durante los períodos de incubación evitando así la exposición directa a la luz.

- 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.
- Agregue 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.

	Procedimiento de ensayo Determinación de T2-Toxina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-096
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

- Agregue 50 µl del conjugado T2-Toxina-enzima (tapón rojo) a los pocillos correspondientes.
- Agregue 50 µl del anticuerpo T2-Toxina (tapón negro) a los pocillos correspondientes, mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube durante 10 minutos (+/- 1) a temperatura ambiente (20 - 25 °C), cubriendo la placa de pozos con papel aluminio.
- Vacíe los pocillos y golpee luego enérgicamente (tres veces consecutivas) el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Lave los pocillos con agua destilada (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.
- Agregue 100 µl de substrato/cromógeno (tapón marrón) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube 5 minutos (+/- 0,5) en la 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 pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente y mida la absorción a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 min.

7. INFORME

Los resultados se analizan de la siguiente manera:


7.1 Registro de datos

Los datos serán registrados en el formato FOR-TC- 071 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de T2-Toxina"

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

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

	Procedimiento de ensayo Determinación de T2-Toxina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-096
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

- 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 alergenicos.
- 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 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.

	Procedimiento de ensayo Determinación de T2-Toxina AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-096
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-14

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.

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- 071 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de humedad "

10. ANEXOS.

Incerto (Ridascreen FAST T2-Toxina Art Nr R5302)