
	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

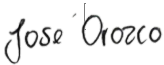

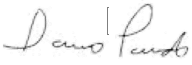
Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo

AOXLAB S.A.S.

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

DOCUMENTO CONTROLADO
 PROC-TC-099 Procedimiento de ensayo para la
 determinación de Caseína por inmunoensayo
 enzimático cuantitativo


Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	José Rodolfo Orozco	Analista de laboratorio		2026-03-06
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Directora calidad		2026-03-09
Aprobó:	Dario Pardo Pardo	Director técnico		2026-03-09
Localización del documento:	Plataforma SGC			


Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2024-09-10	1	Ninguno (versión original).	MTR	APPP	JOZA
Obsoleto	2026-01-30	2	Se establece el aseguramiento de calidad para el ensayo	JROR	SVA	MCDG
Vigente	2026-03-09	3	Se cambia temperatura de extracción	JROR	MCDG	APPP


ÍNDICE

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

1.	OBJETIVO Y ALCANCE.....	5
1.1	Objetivo.....	5
1.2	Alcance.....	5
2.	DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	5
2.1	Definiciones.....	5
2.1.1	Descripción del método.....	6
2.2	Notaciones.....	6
3.	REFERENCIAS.....	6
4.	DESARROLLO.....	7
4.1	Equipos de medición.....	7
4.2	Condiciones generales.....	7
4.2.1	Revisión general.....	7
4.2.2	Estabilización.....	7
4.2.3	Verificación de equipos.....	7
4.2.4	Manejo de la muestra.....	8
4.2.5	Medidas de seguridad.....	8
4.3	Instrucciones de ensayo.....	9
4.3.1	Reactivos contenidos en el kit.....	9
4.3.2	Reactivos no contenidos en el kit.....	10
4.3.3	Preparación de las soluciones contenidas en el kit.....	10
4.3.4	Preparación de las muestras.....	11
4.3.5	Aplicación de la prueba.....	13
4.4	Resultados.....	14
4.4.1	Cálculos.....	14
4.4.2	Interpretación de los resultados.....	15
4.4.3	Aseguramiento de la calidad.....	15
4.4.4	Limitaciones del método.....	17
4.4.5	Recomendación.....	18
5.	RESPONSABILIDADES.....	18
5.1	Director técnico.....	18
5.2	Director de Calidad.....	18
5.3	Coordinador técnico.....	19
5.4	Analista.....	19
6.	FORMATOS RELACIONADOS.....	19

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

7.	ANEXOS.....	19
----	-------------	----

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

[Describir detalladamente los pasos para realizar el análisis de determinación de alérgenos de caseína en diferentes tipos de matrices según el procedimiento RIDASCREEN® FAST Casein (N°Art. R4612) inmunoensayo enzimático cuantitativo [1] y los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [2]

1.2 Alcance.

Helado, vino, chocolate, salchichas y galletas.

Se puede suponer que el ensayo es también adecuado para el análisis de otros alimentos, sin embargo, esto debe ser verificado antes de aplicar el kit de ensayo a esa categoría de alimentos.]

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

[RIDASCREEN® FAST Casein (N. R4612) [1].

Es un inmunoensayo enzimático tipo sándwich para la determinación cuantitativa de la proteína caseína en los alimentos.

Inmunoensayo enzimático (ELISA) [1].


El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas se basa en este reconocimiento anticuerpo-antígeno selectivo y específico. Se han establecido muchos formatos de ensayos ELISA cualitativos y cuantitativos.

La realización de un ensayo ELISA requiere como mínimo un anticuerpo específico para un antígeno concreto. De acuerdo con el método básico, uno de los componentes inmunológicos se inmoviliza en una fase sólida, en las cavidades de la placa de micro titulación. El analito de la muestra interactúa con el sistema anticuerpo-antígeno. Esta interacción se puede visualizar mediante enzimas, enlazadas a antígenos o anticuerpos secundarios, e indica si se ha producido un enlace antígeno-anticuerpo. La enzima enlazada convierte un sustrato agregado, lo que da lugar a un cambio de color, que se puede medir mediante un espectrofotómetro.

Caseína [1]. Hace referencia a una familia de proteínas que se encuentran habitualmente en la leche de los mamíferos.

Documento [2]. Información y su medio de soporte.

Ensayo/prueba [2]. Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

Procedimiento [2]. Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso

2.1.1 Descripción del método

El principio de la prueba es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de las tiras de micro titulación están recubiertos con anticuerpos específicos contra la caseína. Al añadir solución estándar o de muestra a los pocillos, la caseína presente en la muestra se unirá a los anticuerpos de captura específicos, lo que dará lugar a la formación de un complejo anticuerpo-antígeno. Los componentes no unidos por los anticuerpos se eliminan en una fase de lavado. Tras la fase de lavado, se añade una solución que contiene anticuerpos conjugados con peroxidasa. Este conjugado se une al complejo Ab-Ag y se forma un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo (sándwich). Cualquier conjugado no unido se elimina en otro paso de lavado. Se añade una solución de sustrato/cromógeno a los pocillos y se incuba. El conjugado unido convierte el cromógeno incoloro en un producto azul. Se añade una solución de parada que de azul a amarillo. La absorbancia de la solución, que es proporcional a la concentración de caseína en la muestra se mide fotométricamente a 450 nm y se expresa en mg/kg de caseína.

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.

“AEB”: buffer de extracción de alérgenos diluido final.

“A-AEB”: buffer de extracción de alérgenos diluido final con adición de aditivo 1.

“BSA”: Albumina de suero bovino


3. REFERENCIAS.

[1] R-Biopharm. RIDASCREEN®FAST Casein. Art. N°R4612. 2022-05-06

[2] 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.

[3] ISO 9001 :2015 Quality management systems — Requirements Systemes de management de la qualité — Exigences.

[4] ISO 9000:2015 Quality management systems — Fundamentals and vocabulary. |

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

4. DESARROLLO.

4.1 Equipos de medición.

Para realizar el ensayo es necesario los siguientes equipos:

Tabla 1. Equipos necesarios para el procedimiento de alérgenos de caseína.

Equipos
Baño maría con capacidad para calentar a 60 °C Y 100 °C
Balanza analítica con resolución de 0,1 mg
Micropipeta de 100µL - 1000µL
Micropipeta de 20µL- 200µL
Espectrofluorímetro capaz de realizar lecturas a 450nm
Vortex de agitación
Plancha de calentamiento/agitación
Centrifuga para operar a 2500 g

4.2 Condiciones generales.

4.2.1 Revisión general.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, esta 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 10 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- 048 “Formato de datos primarios para la determinación de alérgenos de caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo”, 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.

4.2.3 Verificación de equipos.

Antes de iniciar el ensayo, debe verificarse que el estado de funcionamiento de los

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

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 70% hasta homogeneidad aparente, y realizar un cuarteo atendiendo los siguientes pasos:

1. Colocar la muestra previamente homogeneizada sobre una superficie lisa, limpia y seca, donde no existan corrientes de aire fuertes.
2. Limpiar los instrumentos a utilizar (espátula o cuchara) con alcohol al 70%.
3. Mezclar la muestra echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.
4. Juntar todo el material dándole forma circular con espesor uniforme.
5. Dividir el material en cuatro sectores iguales.
6. Eliminar los sectores opuestos quedando la masa del material reducida a la mitad.
7. Mezclar los dos sectores restantes echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.

4.2.5 Medidas de seguridad.

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar u omitir ningún paso. El ensayo debe realizarse en cabina de extracción y usar los debidos elementos de protección personal.

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

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.

Deben usarse guantes de laboratorio mientras se realiza la extracción de la muestra y la prueba. Los alérgenos transportados por el aire y la falta de limpieza del equipo de laboratorio pueden provocar la contaminación cruzada de la prueba. Por ello, se recomienda tomar las siguientes precauciones:

- Limpie a fondo las superficies, los recipientes de vidrio, los molinos de impacto con etanol al 70% y otros equipos después de cada muestra.
- Realice el procesamiento de la muestra y la realización de la prueba ELISA en salas separadas.


4.3 Instrucciones de ensayo.

4.3.1 Reactivos contenidos en el kit.

El kit de prueba contiene todos los reactivos necesarios para el inmunoensayo enzimático, incluidos los estándares, cuenta con un máximo de 48 ensayos incluyendo los estándares.

Tabla 2. Contenido del kit para la determinación de caseína.

Componente	Color	Formato		Volumen
Placa microtiter	-	Listo para usar		48 pozos
Extractor 2	Azul	Concentrado	2x	30 ml
Extracción de alérgenos buffer	Verde	Concentrado	10x	100 ml
Aditivos 1	Azul			2 g
Estándar 1*	Transparente	Listo para usar	0 mg/kg	1,3 ml
Estándar 2*	Transparente	Listo para usar	0,5 mg/kg	1,3 ml
Estándar 3*	Transparente	Listo para usar	1,5 mg/kg	1,3 ml
Estándar 4*	Transparente	Listo para usar	4,5 mg/kg	1,3 ml
Estándar 5*	Transparente	Listo para usar	13,5 mg/kg	1,3 ml
Tampón de lavado	Marrón	Concentrado	10x	100 ml
Conjugado	Rojo	Concentrado	11x	0,7 ml
Tampón conjugado	Negro	Listo para usar		7 ml.
Sustratos/Cromos Cromógeno rojo Pro	Marrón	Listo para usar		13 ml.
Solución de parada	Amarillo	Listo para usar		14 ml

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

4.3.2 Reactivos no contenidos en el kit

- Hidróxido de sodio (NaOH) 1M
- Ácido clorhídrico (HCl) 1M
- Sí es necesario: Albumina de suero bovino (BSA)

4.3.3 Preparación de las soluciones contenidas en el kit.

Antes de proceder con la preparación de soluciones es necesario tener en cuenta cual es la diferencia entre las extracciones a continuación:

Extracción con AEB: Esta es una extracción específica |||para las matrices como alimentos para bebés no hidrolizados, helados, vino, chocolate, bebidas, embutidos, pasteles de arroz.

Extracción con extractor 2 y A-AEB: Esta es una extracción universal de matrices exceptuando las mencionadas en la extracción AEB

Las muestras individuales extraídas con el extractor 2 y A-AEB (por ejemplo, maíz o productos de maíz, semillas de pino, girasol o calabaza) pueden causar efectos de matriz no específicos en el ELISA para evitarlos, estos extractos de muestras pueden diluirse 1:5 con BSA-AEB **antes de utilizarlos en la prueba (por ejemplo, 400 µl de BSA-AEB + 100 µl de muestra)**. Para ello, se añade BSA (concentración final: 2,5%) a la AEB diluida: por ejemplo, 10 ml de AEB diluida + 0,25 g de BSA.

4.3.3.1 Extracción de muestras con AEB

El buffer de extracción de alérgenos (AEB) se encuentra en una concentración de 10 veces y debe ser diluido antes de su uso. Los cristales presentes en el concentrado deben disolverse por calentamiento (baño de agua 37 °C) antes de la dilución.

Se debe mezclar bien el concentrado.

Preparación: Diluir el concentrado en 1:10 (1+9) con agua destilada (por ejemplo, 100 ml de concentrado+900 ml de agua).


El Buffer de extracción de alérgenos (AEB) diluido tiene una vida útil de aproximadamente 4 semanas a temperatura ambiente (20-25 °C) o 12 Semanas a 2-8 °C. El AEB es necesario para la dilución de los extractos obtenidos para su uso en el ELISA.

NOTA: Para la dilución del extracto de matrices que contengan semillas de pino, girasol o calabaza, el AEB diluido debe mezclarse adicionalmente con BSA (concentración final: 2,5 %; por ejemplo, 10 ml de AEB diluido + 0,25 g de BSA (=BSA-AEB)).

4.3.3.2 Extracción de muestras con A-AEB (Universal)

Para preparar el buffer de extracción de alérgenos con adición del aditivo 1 (A-AEB)

Preparación: Se pesan 1,35 g de aditivo 1 (incluido en el kit) en beacker y disuélvelo con 15 ml de NaOH 1 M. Agitar hasta que el aditivo 1 se haya disuelto.

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

A continuación, vierta 700 mL de AEB diluido en una probeta, añadir los 15 ml de solución con aditivo 1 agitando constantemente; recoger los restos de la solución del aditivo 1 con AEB diluido y verterlos en la probeta.

Ajustar el buffer de extracción de alérgenos (A-AEB) mezclado con el aditivo 1 a pH 9 con HCl 1M y completar hasta 750 mL con AEB diluido.

Esta solución es suficiente para unas 45 muestras, el buffer es estable durante unas 3 semanas a temperatura ambiente (20 - 25 °C) (no conservar en el refrigerador). Deseche el buffer en cuanto se precipiten los cristales. Utilice botellas limpias para la preparación. El polvo sirve de núcleo de cristalización y debe evitarse.

NOTA: Asegúrese de que el A-AEB se calienta a tiempo en el baño de agua de 60 °C (el baño de agua de 100 °C se utiliza para la extracción de las muestras).

4.3.3.3 El Extractor 2

Está disponible como concentrado doble y debe diluirse 1:2 (1 + 1) con agua destilada (por ejemplo, 30 ml de Extractor 2 + 30 ml de agua destilada).

El Extractor 2 completamente diluido es suficiente para 15 muestras y tiene una vida útil de 3 meses a temperatura ambiente (20-25 °C).

4.3.3.4 El conjugado (frasco con tapón rojo)

Está disponible como concentrado de 11 veces. Dado que la solución de conjugado reconstituida tiene una vida útil limitada, mezcle siempre sólo la cantidad de concentrado de conjugado con el buffer de conjugado que se necesite inmediatamente.

Mezclar cuidadosamente el concentrado de conjugado antes de retirarlo. Para preparar el conjugado diluido listo para usar, el concentrado debe diluirse 1:11 (1+10) con buffer de conjugado (por ejemplo: 1 ml de buffer de conjugado + **100 µl de concentrado, suficiente para 1 tiras de micro titulación**).


4.3.4 Preparación de las muestras

Homogeneizar (triturar cuidadosamente, moler finamente y mezclar bien o mezclar bien la solución) una cantidad suficiente de la muestra para garantizar que se toma una muestra representativa.

Extracción de muestras con A-AEB a 60°C.

Calentar el A-AEB a 60 °C antes de la extracción de la muestra.

1. Pesar 1,0000g (o en el caso de muestras líquidas 1,0000 ml) de la muestra homogeneizada y transferirla a un tubo falcon de 50mL, añadir 4 ml de extractor 2 diluido, cerrar el recipiente y mezclar bien en vortex durante 2 minutos.

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

2. Llevar a un baño de agua a 95°C durante 10 minutos.
3. Deje que la muestra se enfríe brevemente a temperatura ambiente (1-2 minutos).
4. Añadir 16 ml (o 15 ml en el caso de muestras líquidas) de A-AEB precalentado a la muestra precalentada.
5. Mezclar bien con un vórtex durante 2 minutos.
6. A continuación, extraer en un baño de agua a 60 °C durante 10 minutos.
7. Deje que la muestra se enfríe brevemente en un baño de hielo (3-5 minutos).
8. Filtrar la muestra o centrifugar durante 10 minutos a 7000 rpm durante 10 minutos (si es posible a 4 °C).

Separar el sobrenadante y transferirlo a un nuevo recipiente, si NO hay sobrenadante libre de partículas después de la centrifugación, los extractos deben ser filtrados adicionalmente. El extracto (sobrenadante del paso de centrifugación o el filtrado) puede almacenarse sin diluir en un recipiente bien cerrado a 2-8 °C hasta su uso en la prueba (vida útil de aproximadamente 3 días). Los extractos NO utilizados también pueden almacenarse sin diluir a -20 °C durante varios meses.

9. Los extractos preparados con extractor 2 y A-AEB deben diluirse 1:5 con AEB antes de utilizarlos en la prueba (por ejemplo: 400 µl de AEB + 100 µl del sobrenadante).

Los extractos de muestra diluidos tienen una vida útil limitada y deben utilizarse en la prueba antes de 30 minutos.

Diluciones adicionales: Si es necesario realizar diluciones más altas de los extractos después de un primer ensayo (muestras con valores de absorbancia (E450nm)>estándar 5), se debe utilizar el siguiente buffer para mantener la misma composición del extracto:


- A-AEB 16ml.
- Extractor 22ml.
- Agua de destino 2ml.

Posteriormente, se realiza la dilución normal con AEB.

Extracción de muestras con AEB para productos alimenticios como alimentos para bebés no hidrolizados, helados, vino, chocolate, bebidas, embutidos, pasteles de arroz.

La extracción descrita a continuación sólo es adecuada para los productos alimenticios mencionados, ya que éstos también pueden procesarse sin el extractor 2, el aditivo 1 y una etapa de cocción.

Calentar el AEB a 60 °C antes de la extracción de la muestra.

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

1. Pesar 1,0000 g (o en el caso de muestras líquidas 1,0000 ml) de la muestra homogeneizada en transferir a un tubo falcón de 25 mL.
2. Añadir 20 mL (o 19 mL en el caso de muestras líquidas) de AEB precalentado.

También se puede procesar 1 ml de vino con 9 ml de AEB. Esto aumenta la sensibilidad (LOD: 0,12 mg/l; LOQ: 0,25 mg/l).

3. Mezclar bien (por ejemplo, con un vórtex).
4. Extraer durante 10 minutos a 60 °C (baño de agua) con agitación ocasional
5. Deje que la muestra se enfríe brevemente en un baño de hielo (3 - 5 minutos).
6. Filtrar la muestra o centrifugar durante 10 minutos (si es posible a 4 °C).

Si no hay sobrenadante libre de partículas después de la centrifugación, los extractos deben ser filtrados adicionalmente.

7. Utilice el extracto (sobrenadante de la etapa de centrifugación o el filtrado) inmediatamente antes del ensayo.

Un periodo más largo puede afectar a la recuperación. Alternativamente, los extractos de la muestra pueden almacenarse en un recipiente bien cerrado a 2- 8 °C durante aproximadamente 1 día. Los extractos no utilizados pueden almacenarse a -20 °C durante varios meses.

4.3.5 Aplicación de la prueba.

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


Utilice los extractos de muestra diluidos inmediatamente (antes de 30 minutos) en el ensayo. Un periodo más largo puede influir en la recuperación.

El lavado cuidadoso es muy importante. Evitar el secado de las cavidades entre los pasos de trabajo. No deben utilizarse más de tres tiras de micro titulación (24 pocillos) por kit de prueba. Si se utilizan más de tres tiras, debe utilizarse una segunda placa sin recubrimiento como placa previa para evitar un retraso de tiempo sobre la placa.

Todos los estándares y las muestras se pipetea en la placa no recubierta (mín. 150 µl por pocillo) y, a continuación, se transfieren rápidamente 100 µl exactos a la placa recubierta con una pipeta de 8 canales.

Se recomienda pipetear el conjugado, el sustrato/cromógeno y la solución de parada con una pipeta multicanal para evitar el retraso en la placa.

- Coloque en el marco de retención tantos pocillos como sean necesarios para todos los estándares y muestras por duplicado. Registre las posiciones de los estándares y las muestras.

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

- Pipetear **100 µl de cada uno de los estándares o de las muestras** diluidas e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).
- Vaciar el líquido de los pocillos en un frasco de residuos, llene todos los pocillos **con 250 µl de buffer de lavado diluido cada uno**, vaciar nuevamente y luego eliminar el líquido residual golpeando enérgicamente (tres veces seguidas) sobre toallitas absorbentes de laboratorio. Repita este procedimiento tres veces más (cuatro ciclos de lavado en total)
- Pipetear **100 µl de conjugado** diluido en cada pocillo e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
- Vaciar el líquido de los pocillos en un frasco de residuos, llene todos los pocillos **con 250 µl de buffer de lavado diluido cada uno**, vaciar nuevamente y luego eliminar el líquido residual golpeando enérgicamente (tres veces seguidas) sobre toallitas absorbentes de laboratorio. Repita este procedimiento tres veces más (cuatro ciclos de lavado en total)
- Pipetear **100 µl de cada sustrato/cromógeno teñido de rojo** en los pocillos e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en la oscuridad.
- Pipetear **100 µl de solución de parada** en cada pocillo y mezclar cuidadosamente de forma manual agitando suavemente la placa.
- Medir la absorbancia a 450 nm en los 10 minutos siguientes a la adición de la solución de parada.


4.4 Resultados

4.4.1 Cálculos.

Para la evaluación, R-Biopharm ofrece un software opcional especialmente desarrollado para los inmunoensayos enzimáticos RIDASCREEN®, el RIDASOFT® Win.NET (Art. No. Z9996FF).

La evaluación puede realizarse mediante una función de 4 parámetros o una función cúbica-spline. Una vez que se ha elegido un método de evaluación, debe conservarse y no cambiarse entre las dos funciones. Debido a la matemática utilizada, no se puede calcular ninguna concentración fuera del rango de medición (<estándar 2 o >estándar 5) utilizando la función spline cúbica.

Para la evaluación, debe aclararse que se cumplen los criterios de calidad para la prueba en curso. El curso de la curva estándar puede tomarse del certificado de análisis adjunto. La prueba también puede evaluarse en caso de determinaciones únicas. Esto no influye en el funcionamiento del kit de pruebas. Sin embargo, para ello hay que crear una evaluación independiente en el software RIDASOFT® Win.NET. La evaluación de las determinaciones individuales no está disponible por defecto. Cada laboratorio puede decidir por sí mismo, tras un análisis cualificado de gestión de riesgos, realizar la prueba

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

en una sola determinación. Sin embargo, hay que señalar que esto no se corresponde con el procedimiento exigido por normas como la EN 15633-1 y la EN 15842. En este caso aumenta el riesgo de pasar por alto errores en la realización de la prueba (por ejemplo, errores de pipeteo). Además, es de esperar una mayor fluctuación de los resultados en las determinaciones individuales.

- Extracción con extractor 2 y A-AEB. Cuando se trabaje de acuerdo con esta normativa, el factor de dilución de las muestras será 100. En los datos de concentración de los estándares ya se ha tenido en cuenta un factor de dilución de la muestra de 20. Por lo tanto, los valores leídos de la curva estándar sólo tienen que ser multiplicados por el factor 5.
- Extracción con AEB: Cuando se trabaja según esta normativa, el factor de dilución de las muestras es de 20.
- Si el vino sólo se extrae con 9 ml de AEB, la dilución inferior de la muestra de 1:10 debe tenerse en cuenta al calcular la concentración de caseína. El valor leído en la curva estándar debe multiplicarse por el factor 0,5.

Dado que ya se ha tenido en cuenta un factor de dilución de la muestra de 20 en los datos de concentración de los estándares, la concentración de caseína puede leerse directamente a partir de la curva estándar.

4.4.2 Interpretación de los resultados

El resultado de la prueba se da en mg de caseína por kg de alimento y, por tanto, indica una concentración de proteínas.


Los resultados entre el LOD y el LOQ pueden indicar un bajo contenido del analito analizado en la muestra. Sin embargo, los valores determinados en este rango tienen una alta incertidumbre debido al alto rango de variación de la prueba. Por lo tanto, los resultados no deben indicarse cuantitativamente como un valor, sino cualitativamente "<LOQ".

Un resultado por debajo del LOD no excluye la contaminación por alérgenos por debajo del límite de detección de esta prueba, o que otros componentes alergénicos, como los lípidos, puedan estar presentes en una muestra. La interpretación del resultado debe formularse en consecuencia.

Las muestras con valores de absorbencia (E450 nm) > estándar 5 pueden diluirse más y determinarse de nuevo. En caso de dilución adicional, el factor de dilución adicional debe tenerse en cuenta al calcular el resultado.

Los valores de absorbencia (E450 nm) más altos de la curva estándar en comparación con los datos según el certificado, especialmente para el estándar cero, pueden indicar un lavado insuficiente o una contaminación por alérgenos.

4.4.3 Aseguramiento de la calidad.

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

Los resultados se registran de la siguiente manera:

Los datos serán registrados en el formato FOR-TC-048 "Formato de datos primarios para la determinación de alérgenos de caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo", se llevará la trazabilidad de todos los registros en el cuadro de mando SOFT-TC-095 "Cuadro de mando para el ensayo Alergenos de Leche (Caseína)"

Los resultados serán guardados en la carpeta L:\LABORATORIO\REGISTROS\REGISTROS RT\Cuadros de Mando\Cuadros de Mando Año \ALÉRGENOS\CASEINA y en cada carpeta guardar el archivo según se requiera, así:

1. Carpeta "Registros Espectrofluorimetro": guardar el archivo de lectura de absorbancias generado por el Gen 5 en el formato Gen5 Experiment(.xpt) con el siguiente nombre "ES-año-099-mes-día-LX".
2. Carpeta "Reportes Gen 5": guardar archivo de las absorbancias en formato PDF con el siguiente nombre "ES-año-099-mes-día-LX".
3. Carpeta "Registros RidaSoft": guardar archivo generado por el Software proporciona por R-Biopharm con el siguiente nombre "RS-año-099-mes-día-LX".

RS: Software RIDASOFT Win.NET Food & Feed

ES: Espectrofluorimetro

Año: los dos últimos dígitos del año en curso

Mes: número del mes en que se realizó el análisis


Día: día en que se realizó el análisis

X: número de análisis realizado en el día

Se debe realizar el montaje de la curva de calibración al inicio del uso de cada nuevo kit. Como criterio de aceptación, se debe efectuar la normalización de las curvas, de manera que la relación B/B_{max} (absorbancia normalizada) de la curva preparada en el laboratorio, en comparación con la curva reportada en el certificado del kit, no presente una desviación superior al 5 %.

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, se debe preparar y analizar:

- Para cada lote de ensayo, se debe ensayar un duplicado por lote. Como criterio general, la desviación relativa porcentual (RPD) no debe ser mayor del 15%. Además de lo anterior, al realizar el análisis de tendencias en la carta control de precisión, debe mostrar que el proceso analítico estuvo bajo control estadístico. Es decir, no deben detectarse tendencias, de acuerdo con lo establecido en el procedimiento PROC-TC-077.
- Para cada lote de análisis, ensayar un blanco de método; es decir, un blanco sometido a todo el proceso de análisis como se realiza para las muestras. Como criterio de aceptación el blanco no debe mostrar concentraciones superiores a la mitad del límite de cuantificación.
- Para cada lote de análisis, duplicado de adición de una matriz representativa del lote preparado a 4 mg/kg. Como criterio general, el error relativo porcentual (ER%) no debe ser mayor del 10%, ni la desviación relativa porcentual (RPD), no puede superar el 10%. Además de lo anterior, al realizar

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

el análisis de tendencias en las cartas control de exactitud y precisión, debe encontrarse que el proceso analítico estuvo bajo control estadístico.

4.4.4 Limitaciones del método

Los resultados de las pruebas pueden variar en función de la matriz, el rendimiento de la prueba y las condiciones del laboratorio.

Los límites de detección y determinación dependen de la matriz de la muestra respectiva, del grado de procesamiento y del procedimiento de extracción. Fuera del rango de medición especificado, se alcanzan los límites técnicos del método de prueba, lo que se nota por las mayores fluctuaciones en los resultados esto puede hacer que las muestras que se encuentran en los límites característicos del método (LOD, LOQ, límite superior del rango de medición) cambien en particular entre los rangos de la curva de calibración.

El pescado crudo se une fuertemente a la caseína, por este motivo, la recuperación puede reducirse al 10 %. Esto también se aplica al pescado cocido si se ha añadido caseína antes de la cocción.

Un pesaje incorrecto de la muestra a analizar influye en el resultado de la medición (por ejemplo, con un peso de +10 %, se mide una concentración un 10 % mayor). Normalmente se obtienen resultados de medición fiables con una desviación máxima de ± 1 %.


Debido al gran número de alimentos, no se pueden excluir los efectos de matriz. Estas pueden dar lugar a falsos positivos o a un aumento de los resultados, pero también pueden reducir o suprimir una reacción correcta. Estos efectos de matriz son independientes de la especificidad del anticuerpo utilizado en la prueba y pueden hacerse visibles mediante pruebas de dopaje.

Mediante la adición de proteínas extrañas (dependiendo de la prueba, por ejemplo, BSA, gelatina, leche desnatada en polvo) durante la extracción o la realización de la prueba, se pueden suprimir los efectos de la matriz si es necesario.

La recomendación para el uso de BSA mencionada en el rendimiento de las pruebas sólo debe aplicarse en este sentido si realmente existe un efecto matriz. Tampoco se limita a las muestras mencionadas, sino que debe entenderse como una recomendación básica para las muestras con efecto matriz.

En los alimentos procesados (por ejemplo, calentamiento, secado, etc.), las proteínas pueden alterarse y/o fragmentarse. Esto puede afectar a la recuperación y a los resultados de las pruebas.

Las reacciones cruzadas son reacciones laterales del anticuerpo utilizado en la prueba con antígenos que tienen epítomos similares al analito buscado. Esto ocurre especialmente con antígenos de especies estrechamente relacionadas. A diferencia de los efectos de

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

matriz, se trata de una reacción específica del anticuerpo con el antígeno. Las estructuras antigénicas están sujetas a influencias similares (por ejemplo, calentamiento, secado, etc.) como el analito real. En casos individuales, las reacciones cruzadas también pueden aparecer por primera vez o perderse debido al procesamiento de los alimentos.

4.4.5 Recomendación

Para garantizar un alto nivel de seguridad analítica, se recomienda

- Siga los requisitos generales de garantía de calidad para los laboratorios que figuran en normas como la EN 15633-1 y la EN 15842 (por ejemplo, realizar determinaciones por duplicado).
- Las puntas de las pipetas deben enjuagarse previamente con el estándar o el extracto de la muestra antes del pipeteo.
- Para el control de calidad y para comprobar que la determinación se realiza correctamente y sin problemas, se llevarán a cabo controles de prueba. Para ello se utilizarán muestras sin caseína y con caseína (contaminadas natural o artificialmente). En el informe de validación se ofrece un ejemplo de dopaje.
- En el caso de muestras extremadamente ácidas o básicas, puede ser necesario ajustar el valor del pH de la muestra a neutro (pH 6,5 a 7,5) antes de la extracción.


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.

	Procedimiento de ensayo para la determinación de Caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-099
		Revisión: 3
		Inicio de vigencia: 2026-03-09

5.3 Coordinador técnico.

- 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.
- 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-048 “Formato de datos primarios para la determinación de alérgenos de caseína por inmunoensayo enzimático cuantitativo”

SOFT-TC-095 “Cuadro de mando para el ensayo Alergenos de Leche (Caseína)” |

7. ANEXOS.

| RIDASCREEN® FAST Casein (N. R4612)
[R4612 FAST Casein 2022-05-06.docx \(r-biopharm.com\)](#)