


<b>aoxlab</b>	Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní  AOXLAB S.A.S	Identificación: <b>PROC-TC-121</b>
		Revisión: <b>1</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b>

# Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní




**AOXLAB S.A.S.**

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

## DOCUMENTO CONTROLADO


### PROC-TC-121 Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní

Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Marian Toro Rúa	Analista Laboratorio		2024-05-17
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Directora Calidad		2024-05-22
Aprobó:	Laura S. Guerra Foronda	Gerente y director técnico		2024-05-22
Localización del documento:		Plataforma SGC		


### Control de Cambios

Estado	Fecha de inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Vigente	2024-05-22	1	Ninguno (versión original).	DPP	YELP	YELP

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

## ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE.....	4
1.1 Objetivo.....	4
1.2 Alcance.....	4
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	4
2.1 Definiciones.....	4
2.3 Notaciones.....	5
3. REFERENCIAS.....	5
4. DESARROLLO.....	5
4.1 Equipos de medición.....	5
4.2 Condiciones generales.....	6
4.2.1 Revisión general.....	6
4.2.2 Estabilización.....	6
4.2.3 Verificación de equipos.....	6
4.2.4 Manejo de la muestra.....	7
4.2.5 Medidas de seguridad.....	8
4.3 Instrucciones de ensayo.....	8
4.3.1 Reactivos y soluciones.....	8
4.3.2 Método de extracción de las muestras.....	9
4.3.3 Aplicación de la prueba.....	10
4.4 Resultados.....	11
4.5 Límites del método.....	12
4.6 Recomendaciones.....	13
4.7 Aseguramiento de calidad.....	14
5. RESPONSABILIDADES.....	14
6. FORMATOS RELACIONADOS.....	16
7. ANEXOS.....	16

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-121</b>
		<b>Revisión:</b> 1
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-05-22</b>

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo.

Describir los pasos para realizar la determinación de alérgenos de maní en diferentes tipos de matrices según el procedimiento RIDASCREEN®Peanut (N°art. R6811) [4] y los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [2].

### 1.2 Alcance.

El kit está diseñado para la determinación arroz inflado, barritas de muesli, galletas, helado, mezcla de frutos secos y chocolate con leche.

- **Límite de detección:** 0,15 mg/kg de maní (corresponde a 0,033 mg/kg de proteína de maní).
- **Límite de cuantificación:** 0,75 mg/kg de maní (corresponde a 0,166 mg/kg de proteína de maní).

## 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

### 2.1 Definiciones.

**RIDASCREEN® Peanut (N.º art. R6811) [1].**

Es un inmunoensayo enzimático en sándwich para la determinación cuantitativa de maní y proteína de maní en alimentos.


El RIDASCREEN está certificado por la AOAC-RI (PTM N.º 112102).

### **Inmunoensayo enzimático (ELISA)**

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 microtitulación. 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.

### 2.2 Descripción del método

La base es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de las tiras de microtitulación están recubiertos con anticuerpos específicos contra las proteínas del maní. Al añadir el estándar o la muestra, las proteínas del maní presentes en la muestra se unen a los anticuerpos de captura específicos, lo que da lugar a la formación de un complejo antígeno anticuerpo.

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-121</b>
		<b>Revisión:</b> 1
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-05-22</b>

Los componentes no unidos se eliminan en un paso de lavado. A continuación, se añade la solución de anticuerpo conjugado con peroxidasa. El anticuerpo conjugado se une al complejo Ak-Ag y se forma un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo (sándwich). El conjugado de anticuerpo no unido se elimina en un nuevo paso de lavado. Se añade una solución de sustrato/cromógeno a las tiras de microtitulación y se incuban. La enzima unida al anticuerpo convierte el cromógeno en un producto final azul. La adición de la solución de parada provoca un cambio de color de azul a amarillo. La absorbancia de la solución, que es proporcional a la concentración de proteína de maní en la muestra, se mide fotométricamente a 450 nm y se expresa en mg/kg de maní o de proteína de maní.

### 2.3 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

“SMP”: Leche desnatada en polvo

## 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 9001 :2015 Quality management systems — Requirements Systemes de management de la qualité — Exigences.
- [3] ISO 9000:2015 Quality management systems — Fundamentals and vocabulary.
- [4] R-Biopharm. RIDASCREEN®FAST Peanut. Art. N°R6811. 2021-12-16.

## 4. DESARROLLO.

### 4.1 Equipos de medición

*Tabla 1. Equipos necesarios para el procedimiento de alérgenos de maní.*

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

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

Vórtex de agitación

## 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- 086 "Formato de registro de datos primarios para la determinación de alérgenos de maní en alimentos", e informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

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

### 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.

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.

Para evitar la humedad en el interior de los pocillos, abra la bolsa de aluminio para retirar los micropocillos sólo después de haber alcanzado la temperatura ambiente. Vuelva a colocar los micropocillos no utilizados en su bolsa de aluminio original, vuelva a cerrarlos junto con el desecante suministrado y consérvelos a una temperatura de entre 2 y 8 °C.

El sustrato/cromógeno rojizo es sensible a la luz. Por lo tanto, evite la exposición a la luz directa.

El baño de maría encenderse y precalentarse a 60° C

### 4.2.3 Verificación de equipos.

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

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.

Verificar que el espectrofluorímetro EL072 se encuentre encendido y en óptimas condiciones para su uso, además, verificar el diagnóstico del equipo arrojado por el software.


#### 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.

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

- 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.
- 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.

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 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.

Esta prueba sólo puede ser realizada por personal de laboratorio formado. Deben seguirse estrictamente las instrucciones de uso para la realización de la prueba.

Este kit puede contener sustancias peligrosas para la salud. Para obtener información sobre la seguridad de los componentes que contiene, consulte las fichas de datos de seguridad (MSDS) de este producto en el sitio web: [www.r-biopharm](http://www.r-biopharm).


### 4.3 Instrucciones de ensayo.

#### 4.3.1 Reactivos y soluciones

##### 4.3.1.1 Reactivos incluidos en el Kit

El kit de prueba contiene todos los reactivos necesarios para el inmunoensayo enzimático, incluidos los estándares, cuenta con un máximo de 96 ensayos incluyendo los estándares.

*Tabla 2. Contenido del kit para la determinación de alérgenos de maní.*

	Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní  <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-121</b>
		Revisión: <b>1</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b>

Componente	Color	Formato		Volumen
Placa de microtitulación	-	Listo para usar		96 pozos
Tampón de extracción de alérgenos	Verde	<b>Concentrado</b>	<b>10x</b>	100 ml
Estándar 1*	Transparente	Listo para usar	0 mg/kg	1,3 ml
Estándar 2*	Transparente	Listo para usar	0,75 mg/kg	1,3 ml
Estándar 3	Transparente	Listo para usar	1,5 mg/kg	1,3 ml
Estándar 4	Transparente	Listo para usar	3,0 mg/kg	1,3 ml
Estándar 5	Transparente	Listo para usar	6,0 mg/kg	1,3 ml
Tampón de lavado	Marrón	<b>Concentrado</b>	<b>10x</b>	100 ml
Conjugado	Rojo	Listo para usar		11 ml
Sustratos/Cromógeno Cromógeno rojo Pro	Marrón	Listo para usar		13 ml
Solución Stop	Amarillo	Listo para usar		14 ml

#### 4.3.1.2 Reactivos NO incluidos en el Kit

- Agua destilada (agua destilada) o agua desionizada
- Leche desnatada en polvo (SMP; calidad alimentaria; sin maní)


#### 4.3.1.3 Preparación de soluciones

- Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente 20 - 25 °C antes de su uso.
- El buffer de extracción de alérgenos se suministra como concentrado multiplicado por 10 y debe diluirse antes de su uso. Antes de diluir el concentrado de buffer, disolver completamente los cristales en un baño de agua a 37 °C y mezclar bien. A continuación, diluir el concentrado buffer calentado 1:10 (1+9) con agua destilada (por ejemplo, 100 ml de concentrado buffer + 900 ml de agua destilada).  
**El buffer de extracción de alérgenos (AEB) diluido es estable a 20 - 25 °C durante aproximadamente 4 semanas o a 2 - 8°C durante 12 semanas. Asegúrese de calentar la AEB a tiempo en el baño de agua a 60°C.**
- El buffer de lavado se encuentra en forma de concentrado 10 veces mayor. Antes de su uso, el buffer debe diluirse 1:10 (1 + 9) con agua destilada (es decir, 100 ml de concentrado de buffer + 900 ml de agua destilada). Antes de la dilución, disolver los cristales eventualmente formados incubando el buffer en un baño de agua a 37 °C (99 °F). El buffer diluido es estable a 20 - 25 °C durante 4 semanas.

#### 4.3.2 Método de extracción de las muestras

##### 4.3.2.1 Extracción con AEB y leche desnatada en polvo (SMP).

El pH de las muestras debe ser neutro.

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

- Calentar la AEB a 60 °C antes de la extracción de la muestra.
- Pesar 1 g (en caso de muestras líquidas 1 ml) de muestra homogeneizada + 1 g de SMP a un tubo falcón de 50 mL.
- Añadir 20 ml (en caso de muestras líquidas 19 ml) de AEB precalentado.
- Mezclar enérgicamente por 2 min con un vórtex.
- Extraer durante 10 min a 60 °C en un baño maría agitando de vez en cuando.
- Dejar enfriar la muestra en agua helada durante 3 - 5 min.
- Filtrar o centrifugar la muestra durante 10 min a >2.500 x g; si es posible a 4°C
- Transferir el sobrenadante a un nuevo vial.
- Si el sobrenadante no está libre de partículas tras la centrifugación, filtrar el extracto.
- El extracto (sobrenadante del paso de centrifugación o filtrado) debe analizarse mediante ELISA el mismo día si se almacena a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Puede almacenarse hasta dos días en un recipiente bien cerrado a 2 – 8 °C. Los extractos no utilizados pueden conservarse a - 20 °C durante un mes.


**Observación:** Como alternativa a pesar la SMP a la muestra, la SMP puede añadirse a la AEB (1 g de SMP por 20 ml de AEB). La vida útil de la SMP-AEB es de sólo 1 día. En caso de muestras con una concentración superior al intervalo de calibración, deberán realizarse diluciones adicionales con la SMP-AEB (1 g de SMP por 20 ml de AEB).

#### 4.3.3 Aplicación de la prueba.

**Siga cuidadosamente el procedimiento de lavado recomendado. No deje que los micropocillos se sequen entre las fases de trabajo.**

No utilice más de tres tiras (24 pocillos) a la vez.

- Inserte un número suficiente de pocillos en el soporte de micropocillos para que todos los estándares y muestras se realicen por duplicado.
- Registre las posiciones de los estándares y las muestras.
- Añadir 100 µl de cada estándar o muestra (preparados según el capítulo) a los pocillos e incubar durante 20 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
- Vaciar el líquido de los pocillos y golpear enérgicamente el soporte de micropocillos boca abajo (tres veces) sobre papel absorbente para garantizar la eliminación completa del líquido de los pocillos. **Llenar todos los pocillos con 250 µl de buffer de lavado diluido y verter el líquido como antes. Repetir tres veces más (un total de cuatro ciclos de lavado).**
- Añadir 100 µl del conjugado a cada pocillo e incubar durante 20 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
- Vaciar el líquido de los pocillos y golpear enérgicamente el soporte de micropocillos boca abajo (tres veces seguidas) sobre papel absorbente para garantizar la eliminación completa del líquido de los pocillos. **Llena todos los**

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

pocillos con 250 µl de buffer de lavado diluido y verter el líquido como antes. Repetir tres veces más (un total de cuatro ciclos de lavado).

- Añadir 100 µl del sustrato/cromógeno rojizo a cada pocillo e incubar durante 10 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C) en la oscuridad.
- Añadir 100 µl de la solución de parada a cada pocillo.
- Mezclar suavemente agitando la placa manualmente y medir la absorbancia a 450 nm.
- Leer antes de 10 min después de añadir la solución de parada.

**NOTA:** Los datos actuales muestran que la medición es posible hasta 30 minutos después de la adición de la solución de parada (no forma parte de la aprobación de la AOAC). **Para la aprobación de la AOAC, se especificó una medición en 10 min.**

#### 4.4 Resultados

##### 4.4.1 Cálculos

Para la evaluación de los inmunoensayos enzimáticos RIDASCREEN® se dispone opcionalmente de un software especial, el RIDASOFT® Win.NET (N.º art. Z9996).

Los valores de concentración de los estándares ya tienen en cuenta el factor de dilución de 20 resultante de la preparación de la muestra. Esto significa que la concentración de maní de las muestras puede leerse directamente a partir de la curva estándar.

**La evaluación debe realizarse utilizando la función de 4 parámetros.**

Para la evaluación debe confirmarse que se cumplen los criterios de calidad para la prueba en curso. **La forma de la curva estándar debe coincidir estrechamente con la forma de la curva estándar impresa en el certificado de análisis.**


El ensayo también puede evaluarse cuando se ejecuta en un solo pocillo por extracto. Esto no influye en el funcionamiento del kit de ensayo.

##### 4.4.2 Interpretación de los resultados.

**El resultado de la prueba se calcula en mg de maní por kg de alimento.**

Para calcular la concentración de proteína de maní en mg/kg puede utilizarse el 0,222 determinado a partir del contenido de proteína del 22,2 % del material patrón de referencia de maní. Multiplique el resultado obtenido en mg de maní por kg de alimento por 0,222 para obtener el contenido de proteína de maní en la matriz alimentaria.

Los resultados entre LOD y LOQ indican una baja concentración de maní en la muestra. Los resultados calculados muestran una elevada incertidumbre en este ámbito debido a

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

la alta variación del método por debajo del LOQ. Por lo tanto, tales resultados no deben notificarse con un valor cuantitativo, sino cualitativo como "<LOQ".

Un resultado por debajo del LOD no excluye una contaminación por alérgenos por debajo del límite de detección del ensayo, o que otros componentes del maní, como los lípidos, puedan estar presentes en una muestra. El resultado debe notificarse en consecuencia.

#### 4.5 Límites del método.

Los resultados de las pruebas pueden variar en función de la matriz de la muestra, el procedimiento real de la prueba y el entorno del laboratorio.

Los límites de detección y cuantificación dependen de la matriz de la muestra respectiva, del grado de procesamiento y del método de extracción.

El contenido y la composición proteínicos pueden variar en las distintas variedades de maní. Por lo tanto, distintas variedades de maní pueden dar resultados diferentes, ya que la prueba se calibró con variedades de maní ejemplares utilizadas con el material estándar.


Los límites técnicos del método de ensayo se aproximan fuera del rango de medición designado, lo que da lugar a una mayor variación. Esto puede provocar un cambio de resultados entre las distintas zonas de la curva de calibración, especialmente en los límites de las características de ensayo (LOD, LOQ, límite superior del intervalo de medida).

Un peso incorrecto de la muestra a analizar tendrá un efecto de 1:1 en el resultado de la medición (por ejemplo, una concentración un 10 % mayor se mide con un peso en +10 %). Se obtiene una precisión suficiente con una fluctuación máxima de  $\pm 1$  %.

Para el presente ELISA, sólo se pudieron validar alimentos individuales y ejemplares de diferentes categorías de productos, debido al gran número de alimentos. Cuando se analice una matriz no validada, se recomienda verificar. Los resultados obtenidos mediante experimentos de picos. En caso necesario, deberá realizarse una validación de la matriz de muestra de interés.

##### 4.5.1 Interferencias

Las reactividades cruzadas de los anticuerpos utilizados en esta prueba se determinaron para el alimento puro (por ejemplo, harina de maíz). En un alimento compuesto/procesado (por ejemplo, pan de maíz), estas reactividades cruzadas pueden verse alteradas. Las sustancias potencialmente interferentes (por ejemplo, polifenoles) pueden reconocerse mediante pruebas de dopaje.

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

Debido a la multitud de tipos de alimentos, no pueden excluirse los efectos de matriz. Estos pueden dar lugar a resultados falsos positivos/aumentados, pero también 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 experimentos de adición.

En los alimentos procesados (por ejemplo, tratamiento térmico, deshidratación, etc.), las proteínas pueden alterarse o fragmentarse, lo que puede repercutir en la recuperación y en los resultados de los ensayos.


Las reactividades cruzadas son reacciones secundarias del anticuerpo utilizado para preparar el kit de prueba con antígenos que muestran epítomos similares a los del analito investigado. Aparecen especialmente con antígenos de especies estrechamente relacionadas. **A diferencia de los efectos de matriz, se trata de una reacción específica del antígeno con el anticuerpo.**

Las estructuras del antígeno están sujetas a influencias similares (por ejemplo, por calentamiento o secado) a las del analito real. Por lo tanto, las reactividades cruzadas también pueden aparecer tras el procesado de alimentos en un solo caso o se pierden.

Para la evaluación de la reactividad cruzada sólo se analizó una muestra representativa, otras muestras pueden mostrar un resultado diferente. Todas las reactividades cruzadas analizadas se describen en el informe de validación.

#### 4.6 Recomendaciones.

- Para garantizar un alto rendimiento analítico recomendamos:
- Cumplir los requisitos generales de aseguramiento de la calidad para laboratorios que figuran en normas como EN 15633-1 y EN 15842 (por ejemplo, realizar determinaciones por duplicado).
- Para prelavado de las puntas de pipeta con extracto estándar o de muestra antes del pipeteado.
- Llevar consigo controles de ensayo para el control de calidad y para garantizar un procedimiento de ensayo preciso y correcto. Deben utilizarse muestras sin maní y muestras que contengan maní (contaminadas naturalmente o con *spikes*). En el informe de validación se ofrece un ejemplo de experimento con picos.
- En caso de muestras extremadamente ácidas o básicas, ajuste el valor de pH de la muestra (pH 6,5 - 7,5) a neutro antes de la extracción.
- Se recomienda una dilución adicional y una nueva detección de las muestras para valores de absorbancia (A450 nm) > estándar 5. En caso de una dilución adicional, debe tenerse en cuenta el factor de dilución adicional al calcular la concentración

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

de maní. Las diluciones adicionales deben realizarse con la SMP-AEB (1 g de SMP por 20 ml de AEB). En comparación con el certificado, los valores más altos de absorbancia (A450 nm) para la curva estándar, especialmente para el estándar cero, pueden ser el resultado de un lavado insuficiente o de la contaminación de los manís.

#### 4.7 Aseguramiento de calidad.

Los resultados se registran de la siguiente manera:

Los datos serán registrados en el formato FOR-TC- 086 "Formato de registro de datos primarios para la determinación de alérgenos de maní en alimentos" se llevará la trazabilidad de todos los registros en el cuadro de mando SOFT-TC-098 "Cuadro de mando para la determinación de alérgenos de maní en alimentos."

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

- Carpeta "Registros espectrofluorímetro": guardar el archivo de lectura de absorbancias generado por el Gen 5 en el formato Gen5 Experiment (.xpt) con el siguiente nombre "ES-año-121-mes-día-LX".
- Carpeta "Reportes Gen 5": guardar archivo de las absorbancias en formato PDF con el siguiente nombre "ES-año-121-mes-día-LX".
- Carpeta "Registros RidaSoft": guardar archivo generado por el Software proporciona por R-Biopharm con el siguiente nombre "RS-año-121-mes-día-LX".

RS: Software RIDASOFT Win.NET Food & Feed

ES: espectrofluorímetro

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 ]

#### 5. RESPONSABILIDADES.

##### 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.

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

**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.

**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.

**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.

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de maní</p> <p><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-121</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-22</b></p>

## 6. FORMATOS RELACIONADOS.

FOR-TC- 086 "Formato de registro de datos primarios para la determinación de alérgenos de maní en alimentos"

SOFT-TC-098 "Cuadro de mando para la determinación de alérgenos de maní en alimentos." |

## 7. ANEXOS.

RIDASCREEN® Peanut Art. N°. R6811

<https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/r6811-peanut-2021-12-16.pdf> |