


<b>aoxlab</b>	Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo  AOXLAB S.A.S	Identificación: <b>PROC-TC-147</b>
		Revisión: <b>1</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b>

# Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo




**AOXLAB S.A.S.**

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

## DOCUMENTO CONTROLADO


### PROC-TC-147 Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo

Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Mariana Toro Rúa	Analista de laboratorio		2024-05-17
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Directora calidad		2024-05-21
Aprobó:	Laura S. Guerra Foronda	director técnico		2024-05-21
Localización del documento:		Plataforma SGC		


### Control de Cambios

Estado	Fecha de inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Vigente	2024-05-21	1	Ninguno (versión original).	DPP	YELP	YELP

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p style="text-align: center;"><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-147</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-05-21</b>

## ÍNDICE

<b>1. OBJETIVO Y ALCANCE.....</b>	<b>4</b>
1.1 Objetivo.....	4
1.2 Alcance.....	4
<b>2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.....</b>	<b>4</b>
2.1 Definiciones.....	4
2.1.1 Descripción del método.....	5
2.2 Notaciones.....	5
<b>3. REFERENCIAS.....</b>	<b>5</b>
<b>4. DESARROLLO.....</b>	<b>5</b>
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.....	7
4.2.4 Manejo de la muestra.....	7
4.2.5 Medidas de seguridad.....	8
4.3 Instructivos de ensayo.....	8
4.3.1 Reactivos y soluciones.....	8
4.3.1.1 Reactivos incluidos en el Kit.....	8
4.3.1.2 Preparación de soluciones.....	8
4.3.2 Extracción de la muestra.....	9
4.3.3 Aplicación de la prueba.....	10
4.3.4 Resultados.....	11
4.3.5 Límites del método.....	13
4.3.6 Recomendaciones.....	13
4.3.7 Aseguramiento de la calidad.....	14
<b>5. RESPONSABILIDADES.....</b>	<b>14</b>
<b>6. FORMATOS RELACIONADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>16</b>

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo.

Describir los pasos para realizar la determinación de alérgenos de proteína de huevo en diferentes tipos de matrices según el procedimiento ELISA RIDASCREEN® FAST Ei/Egg Protein (Art. No. R6402) [1] y los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [2].

### 1.2 Alcance.

Debido a la gran variedad de alimentos existentes, se analizaron las siguientes muestras como representantes de diferentes categorías de productos como parte del desarrollo de la prueba: Helado, pasta, aderezo para ensaladas y vino.

#### Límite de detección:

0,096 mg/kg de huevo entero en polvo\*. El cual corresponde a 0,03 mg/kg de proteína de clara de huevo

0,052 - 0,157 mg/kg de huevo entero en polvo.

\*Valor medio.

#### Límite de cuantificación:

0,5 mg/kg de huevo entero en polvo corresponde a 0,13 mg/kg de proteína de clara de huevo.

## 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.


### 2.1 Definiciones.

**RIDASCREEN® FAST Ei / Egg Protein (nº art. R6402) [1].**

Es un inmunoensayo enzimático en sándwich para la determinación cuantitativa de huevo entero (en polvo) en alimentos.

#### **Inmunoensayo enzimático (ELISA) [1].**

El ensayo por inmunoadsorción 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.

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-147</b>
		<b>Revisión:</b> 1
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-05-21</b>

### 2.1.1 Descripción del método.

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

La enzima unida al anticuerpo convierte el cromógeno incoloro 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 clara de huevo en la muestra, se mide fotométricamente a 450 nm y se expresa en mg/kg de huevo entero en polvo.

### 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] R-Biopharm. RIDASCREEN® FAST Ei/Egg Protein (Art. No. R6402).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.

## 4. DESARROLLO.

### 4.1 Equipos de medición

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

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

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
Espectrofluorimetro capaz de realizar lecturas a 450nm
Centrifuga para operar a 2500 g

## 4.2 Condiciones generales.

### 4.2.1 Revisión general.

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

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, 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- 097 "Formato para el registro de datos primarios para el ensayo de huevo", 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.

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

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

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.

El baño de maría encenderse y precalentarse a 60 °C.

#### 4.2.3 Verificación de equipos.

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

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

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


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.

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

#### 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 Instructivos de ensayo.

#### 4.3.1 Reactivos y soluciones


##### 4.3.1.1 Reactivos incluidos en el Kit

El kit contiene todos los reactivos necesarios para el inmunoensayo enzimático, incluidos los estándares. El kit de prueba es suficiente para un máximo de 48 determinaciones (incluidos los estándares).

*Tabla 2. Contenido del kit para la determinación de huevo.*

Componente	Color	Formato		Volumen
Placa de microtitulación	-	Listo para usar		48 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	0,5 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	<b>Concentrado</b>	<b>10x</b>	100 ml
Conjugado	Rojo	<b>Concentrado</b>	<b>11x</b>	0,7 ml

##### 4.3.1.2 Preparación de soluciones


	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

- 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 tampón, disuelva completamente los cristales en un baño de agua a 37 °C y mezcle bien. A continuación, diluir el concentrado buffer calentado 1:10 (1+9) con agua destilada (es decir, 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 aprox. 4 semanas o a 2 - 8 °C durante 12 semanas.**
- El conjugado (frasco con tapón rojo) se suministra como concentrado a 11 veces. Dado que el conjugado diluido tiene una estabilidad limitada, sólo debe diluirse la cantidad realmente necesaria. Antes de pipetear, el concentrado de conjugado debe agitarse cuidadosamente. Para la reconstitución, el concentrado de conjugado se diluye 1:11 (1+10) en agua destilada (es decir, a 2 mL de agua destilada + 200 µl de conjugado, suficiente para 2 tiras de microtitulación).
- El buffer de lavado se suministra como concentrado 10 veces mayor. Antes de su uso, el buffer debe diluirse 1:10 (1+9) con agua destilada (es decir, a 900 mL de agua destilada + 100 mL de concentrado de tampón). Antes de la dilución, disolver los cristales eventualmente formados incubando el buffer en un baño de agua a 37 °C. El buffer diluido es estable a 20 - 25°C durante 4 semanas.

#### 4.3.2 Extracción de la muestra.

*Antes de realizar la extracción, homogeneizar (triturar bien hasta obtener polvo y mezclar bien o mezclar bien una solución, respectivamente) bien una cantidad suficiente (por ejemplo, 50 g o 50 mL) para garantizar la toma de una porción de muestra representativa.*

- Calentar la AEB a 60 °C antes de la extracción de la muestra.
- *Pesar 1,0000 g (o en caso de muestras líquidas 1 mL) de muestra homogeneizada a un tubo falcón de 50mL*
- *Añadir 20 mL (o 19 mL en caso de muestras líquidas) de AEB precalentado. cerrar el vial y mezclar bien.*
- *Mezclar energicamente por 2 min en vórtex.*
- *Extraer durante 10 min a 60 °C en un baño maría.*
- *Dejar enfriar la muestra brevemente (por ejemplo, en agua helada 3 - 5 min).*
- *Centrifugar A 7000 rpm durante 10 minutos.*
- *Si el sobrenadante no está libre de partículas tras la centrifugación, filtrar adicionalmente el extracto.*

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

- Los extractos de muestras (sobrenadante de la centrifugación o filtrado) pueden conservarse hasta *tres días aprox* en un recipiente bien cerrado a 2-8 °C.
- Los extractos no utilizados pueden almacenarse a -20 °C durante varios meses.

**Observación:** En el caso de muestras que contengan alholva, clavo, mostaza o apio, añada 1 g de caseína a 1 g o 1 mL de muestra para evitar efectos perturbadores. Cuando se analicen muestras de composición desconocida, puede añadirse caseína como precaución.

#### 4.3.3 Aplicación de la prueba.


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

Se recomienda pipetear el conjugado, el sustrato/cromógeno y la solución de parada con una pipeta multicanal o paso a paso para evitar un desplazamiento temporal sobre la placa.

**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 por duplicado a los pocillos e incubar durante 10 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C)
- Vaciar el líquido de los pocillos en los residuos 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 dos veces más** (un total de tres ciclos de lavado).
- Añadir 100 µl del **conjugado diluido** a cada pocillo e incubar durante 10 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 dos veces más** (un total de tres ciclos de lavado).
- Añadir 100 µl de sustrato/cromógeno 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.

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

- Leer en los 30 min siguientes a la adición de la solución de parada.

#### 4.3.4 Resultados

##### 4.3.4.1 Cálculos.

**El resultado se expresa en mg/kg de huevo entero en polvo.**

Cuando se trabaja de acuerdo con esta extracción, el factor de dilución de la muestra es 20. Por lo tanto, ya se tiene en cuenta un factor de dilución de 20 con las concentraciones patrón la concentración de huevo entero en polvo puede leerse directamente a partir de la curva patrón.

##### **Ejemplo de cálculo:**

A partir de la curva estándar se leen 10 mg/kg de huevo entero en polvo. Si se multiplica el resultado por 0,48, se obtienen 4,8 mg/kg de proteína de huevo entero. Si se multiplica el resultado por 0,263, se obtienen 2,63 mg/kg de proteína de clara de huevo.

Para la evaluación de los inmunoensayos enzimáticos RIDASCREEN® se dispone opcionalmente de un software especial, RIDASOFT® Win.NET (nº art. Z9996FF).

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


Una vez seleccionado un método de evaluación, debe conservarse y no alternar entre las dos funciones. Debido a su base matemática, la función spline cúbica no puede calcular concentraciones fuera del rango de medición (< estándar 2 y > estándar 5). La función de 4 parámetros permite calcular valores comprendidos entre la norma 1 y la norma 2. 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.**

**Observación:** El ensayo también puede evaluarse cuando se ejecuta en determinaciones únicas. Esto no influye en el funcionamiento del kit de ensayo. Para ello, debe escribirse una evaluación de ensayo especial en el software RIDASOFT® Win.NET. No está presente por defecto. Cada laboratorio puede decidir realizar el ensayo en determinaciones individuales tras un análisis cualificado de gestión de riesgos. Sin embargo, no es coherente con normas como EN 15633-1 y EN 15842. Debe tenerse en cuenta que esto aumenta el riesgo de pasar por alto errores en la realización del ensayo (por ejemplo, errores de pipeteo). Además, se producirá una mayor variación de los resultados al pipetear en determinaciones únicas.

##### 4.3.4.2 Interpretación de los resultados.

La prueba se calibra con respecto al material de referencia 8445 de NIST (huevo entero en polvo). El resultado se expresa en mg/kg de huevo entero en polvo.

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

- **El material de referencia 8445 contiene 48 % +1 % de proteína total.**
- Si el resultado se multiplica por 0,48, entonces el resultado puede expresarse como mg/kg de proteína total. Si el resultado se multiplica por 0,263, entonces se obtienen mg/kg de proteína de clara de huevo.

Los resultados entre LOD y LOQ indican una baja concentración de alérgenos en la muestra. Los resultados calculados muestran una alta incertidumbre en esta área debido a la alta variación del método por debajo del LOQ. Por lo tanto, dichos resultados no deben notificarse con un valor cuantitativo, sino cualitativo como "<LOQ".

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

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 de alérgenos.

**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 por alérgenos.**

#### 4.3.4.3 Interferencias


Para muestras que contengan fenogreco, clavo, mostaza o apio, añada 1 g de caseína a 1 g o 1 ml de muestra para evitar efectos de interferencia. Si se desconoce la matriz, puede añadirse caseína como precaución.

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

Debido al gran número de alimentos, no pueden descartarse los efectos matriz. Éstos pueden dar lugar a resultados falsos positivos / elevados, 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 visualizarse mediante pruebas de dopaje.

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 puede suprimir los efectos de matriz si es necesario.

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

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

#### 4.3.5 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.

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  $\pm 1$  %.

#### 4.3.6 Recomendaciones

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.

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).
- Enjuague previamente las puntas de pipeta con extracto estándar o de muestra antes de pipetear.
- Lleve consigo controles de la prueba para el control de calidad y para garantizar un procedimiento de prueba preciso y correcto. Deben utilizarse muestras sin huevo y con huevo (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, puede ser necesario ajustar el valor de pH de la muestra (pH 6,5 - 7,5) a neutro antes de la extracción.

	<p style="text-align: center;">Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

#### 4.3.7 Aseguramiento de la calidad.

Los resultados se registran de la siguiente manera:

Los datos serán registrados en el formato FOR-TC-097 "Formato de registro de datos primarios para la determinación de alérgenos de huevo en alimentos", se llevará la trazabilidad de todos los registros en el cuadro de mando SOFT-TC-096 "Cuadro de mando para la determinación de alérgenos de huevo 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-147-mes-día-LX".
- Carpeta "Reportes Gen 5": guardar archivo de las absorbancias en formato PDF con el siguiente nombre "ES-año-147-mes-día-LX".
- Carpeta "Registros RidaSoft": guardar archivo generado por el Software proporciona por R-Biopharm con el siguiente nombre "RS-año-147-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 huevo</p> <p style="text-align: center;">AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</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.

### **6. FORMATOS RELACIONADOS.**

|FOR-TC-097 "Formato de registro de datos primarios para la determinación de alérgenos de huevo en alimentos"

	<p>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de huevo</p> <p><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-147</b></p>
		<p>Revisión: <b>1</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-05-21</b></p>

SOFT-TC-096 Cuadro de mando para la determinación de alérgenos de huevo en alimentos.” ]

## 7. ANEXOS.

RIDASCREEN® EggArt. No.: R6411

<https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/r6402-fast-egg-2022-05-06.pdf> ]