


<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-209</b>
		Revisión: <b>1</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-09-11</b>

# Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo

**AOXLAB S.A.S.**

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>

## DOCUMENTO CONTROLADO


### PROC-TC-209 Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo

Copia controlada No.: **1**

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
<b>Elaboró:</b>	[Mariana Toro Rúa	[Analista laboratorio		[2024-09-05
<b>Revisó:</b>	[Angela P. Patiño Pérez	[Directora Calidad		[2024-09-09
<b>Aprobó:</b>	[Jonatan Zárate Álvarez	[Director técnico		2024-09-10
<b>Localización del documento:</b>		Plataforma SGC		


### Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
[Vigente	2024-09-05	1	Ninguno (versión original).	MTR	YELP	YELP

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>

## ÍNDICE

<b>1. OBJETIVO Y ALCANCE.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Objetivo .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Alcance.....</b>	<b>4</b>
<b>2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Definiciones.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Notaciones.....</b>	<b>4</b>
<b>3. REFERENCIAS.....</b>	<b>5</b>
<b>4. DESARROLLO.....</b>	<b>6</b>
<b>4.1 Equipos de medición.....</b>	<b>6</b>
<b>4.2 Condiciones generales.....</b>	<b>6</b>
<b>4.2.1 Revisión general.....</b>	<b>6</b>
<b>4.2.2 Estabilización.....</b>	<b>6</b>
<b>4.2.3 Verificación de equipos.....</b>	<b>7</b>
<b>4.2.4 Manejo de la muestra.....</b>	<b>7</b>
<b>4.2.5 Medidas de seguridad.....</b>	<b>8</b>
<b>4.3 Instrucciones de ensayo.....</b>	<b>8</b>
<b>4.3.1 Reactivos contenidos en el kit.....</b>	<b>8</b>
<b>4.3.2 Preparación de los reactivos.....</b>	<b>9</b>
<b>4.3.3 Preparación de la muestra.....</b>	<b>10</b>
<b>4.3.4 Resultados.....</b>	<b>15</b>
<b>5. RESPONSABILIDADES.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1 Director técnico.....</b>	<b>16</b>
<b>5.2 Director de Calidad.....</b>	<b>16</b>
<b>5.3 Líder de Laboratorio.....</b>	<b>16</b>
<b>5.4 Analista.....</b>	<b>17</b>
<b>6. FORMATOS RELACIONADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>17</b>

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo

Describir detalladamente los pasos para realizar el análisis de determinación de alérgenos de pescado en las matrices descritas según el procedimiento Kit ELISA para Proteína de Pescado (N°Art.70201175737) inmunoensayo enzimático cuantitativo [1] y los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [2]

### 1.2 Alcance.

El Kit ELISA para Proteína de Pescado 3M™ está diseñado para la detección de proteínas de pescado en el agua de lavado final del sistema cerrado de limpieza (CIP, por sus siglas en inglés), las muestras de hisopado ambiental, ingredientes para producir alimentos y productos alimenticios procesados.

El **Límite de Detección analítico** es de 2,7 ng/mL (ppb).

El **Límite de Cuantificación analítico** es 1 mg/Kg (ppm). ]

## 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

### 2.1 Definiciones.


[**Kit ELISA para Proteína de Pescado (N°Art.70201175737) inmunoensayo enzimático cuantitativo [1].**

El Kit ELISA para Proteína de Pescado 3M usa una prueba ELISA sándwich. Las proteínas de pescado presentes en la muestra reaccionan con el anticuerpo anti-pescado, que se ha absorbido en la superficie de los pocillos de micro titulación de poliestireno. Después de remover las proteínas libres mediante lavado, se añaden los anticuerpos anti-pescado conjugados con peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés). Estos anticuerpos marcados con enzimas forman complejos con la proteína de pescado previamente unida. Después de un segundo paso de lavado, la enzima unida al inmunoabsorbente se detecta mediante la adición de un sustrato cromogénico, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, por sus siglas en inglés). El desarrollo de color de esta reacción enzimática varía directamente con la concentración de proteína de pescado en la muestra analizada. Por consiguiente, la absorbancia, a 450 nm, indica la concentración de proteína de pescado en la muestra de prueba. La cantidad de proteína de pescado en la muestra de prueba se puede extrapolar a partir de la curva estándar, construida a partir de soluciones estándar de concentración conocida y se ajusta para considerar la dilución de la muestra. ]

### 2.2 Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

[**"Laboratorio":** se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>

“**Servicios**”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

“**Ítem**”: se refiere a los objetos o materiales bajo ensayo. ]

### 3. REFERENCIAS.

- [1] ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- [2] ISO 9001 :2015 Quality management systems — Requirements Systemes de management de la qualité — Exigences.
- [3] ISO 9000:2015 Quality management systems — Fundamentals and vocabulary.
- [4] Kit ELISA para Proteína de Pescado. 3M. 2022-03 ]

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-209</b>
		Revisión: <b>1</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-09-11</b>

#### 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 pescado.*

Equipos
Baño maría con capacidad para calentar a 50-60 °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-189. Formato para el registro de datos primarios para alérgenos de pescado" 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.

El baño de maría encenderse y precalentarse a 60 °C

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>

#### 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, y realizar un cuarteo atendiendo los siguientes pasos:

Colocar la muestra previamente homogeneizada sobre una superficie lisa, limpia y seca previamente desinfectada con etanol al 70%, donde no existan corrientes de aire fuertes.

- Limpiar los instrumentos a utilizar con etanol al 70%.
- Mezclar la muestra echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.
- 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.

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>

#### 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.neogen.com](http://www.neogen.com).







### 4.3 Instrucciones de ensayo.

#### 4.3.1 Reactivos contenidos en el kit.

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


Artículo	Identificación	Preparación (consulte la sección Preparación de Reactivos para obtener información detallada)	Almacenamiento	Estabilidad
Pocillos del Kit ELISA para Proteína de Pescado 3M™  	Una bolsa metálica con una placa de 96 pocillos removibles revestidos con anticuerpos.	Listo para usar.	A una temperatura de entre 2 °C y 8 °C en una bolsa metálica sellada con desecante.	Vuelva a sellar la bolsa metálica con los pocillos sin utilizar y el desecante. Almacene entre 2 °C y 8 °C para mantener la estabilidad hasta la fecha de vencimiento del kit.
3M™ Conjugado de Pescado HRP (10X)  	Un vial con 1,5 mL de anticuerpo conjugado (10X) de peroxidasa de rábano (HRP) 10X.	Diluya en una proporción de 1/10 inmediatamente antes de usar para preparar una solución de trabajo 1X.	A una temperatura de entre 2 °C y 8 °C en la oscuridad.	El conjugado 10X es estable hasta la fecha de vencimiento del kit.

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>

<b>Concentrado Estándar de Proteína de Pescado 3M™</b> 	Un vial con una concentración conocida de proteína de pescado.	Consulte la Sección del Procedimiento ELISA para conocer la preparación estándar.	A una temperatura de entre 2 °C y 8 °C. No congelar.	El concentrado Estándar de Proteína de Pescado 3M es estable hasta la fecha de vencimiento del kit.
<b>3M™ Diluyente (5X)</b> 	Un frasco con 50 mL de Diluyente 5X.	Diluya en una proporción de 1/5 inmediatamente antes de usar para preparar una solución de trabajo 1X.	A una temperatura de entre 2 °C y 8 °C	La 3M Solución Diluyente 5X es estable hasta la fecha de vencimiento del kit.
<b>Solución de Lavado 3M™ (20X)</b> 	Un frasco con 50 mL de Solución de Lavado 20X.	Diluya 1/20 para preparar una solución de trabajo 1X.	A una temperatura de entre 2 °C y 8 °C tanto para la solución de trabajo 1X como para el concentrado de la Solución de Lavado 20X.	La Solución de Lavado 3M 20X es estable hasta la fecha de vencimiento del kit. La Solución de Lavado 1X es estable durante al menos una semana desde la preparación.
<b>3M™ Solución Amortiguadora de Extracción E26 (4X)</b> 	Un frasco con 120 mL de solución amortiguadora de extracción 4X.	Diluya 1/4 para preparar una solución de trabajo 1X. La solución de trabajo se debe calentar hasta 50 °C o 60 °C antes de su uso.	Almacene tanto para la solución de trabajo 1X como el concentrado de la 3M Solución Amortiguadora de Extracción 4X a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.	La Solución Amortiguadora de Extracción 1X y la 3M Solución Amortiguadora de Extracción 4X son estables hasta la fecha de vencimiento del kit.
<b>3M™ Solución de Sustrato Cromogénico</b> 	Un frasco con 12 mL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).	Listo para usar.	A una temperatura de entre 2 °C y 8 °C en la oscuridad.	Proteja de la luz. La 3M Solución de Sustrato Cromogénico es estable hasta la fecha de vencimiento del kit.
<b>3M™ Solución de Paro</b> 	Un frasco de 12 mL de ácido sulfúrico 0.3 M.	Listo para usar.	A una temperatura de entre 2 °C y 8 °C	La 3M Solución de Paro es estable hasta la fecha de vencimiento del kit.

#### 4.3.2 Preparación de los reactivos.

Lleve todos los reactivos a temperatura ambiente (entre 20 °C y 25 °C) antes de su uso. Use elementos de laboratorio limpios para diluir y almacenar las soluciones de trabajo.

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>

- **3M Solución Amortiguadora de Extracción:**

Para preparar una Solución Amortiguadora de Extracción 1X, añada una parte de 3M Solución Amortiguadora de extracción (4X) y dilúyala en tres partes de agua desionizada o destilada. Precaliente la Solución Amortiguadora de extracción (1X) a una temperatura de entre 50 °C y 60 °C en un baño de agua o en una incubadora con agitación antes de su uso. Cada muestra requiere 4.5 mL de Solución Amortiguadora de Extracción 1X.

- **3M Solución Diluyente:**

Para preparar una Solución Diluyente 1X, añada una parte de 3M Diluyente (5X) a cuatro partes de agua desionizada o destilada. Cada muestra requiere un total de 4.5 mL de Solución Diluyente 1X.

- **Solución de Lavado 3M:**

Para preparar una Solución de Lavado 1X, añada una parte de Solución de Lavado 3M (20X) a 19 partes de agua desionizada o destilada. Cada pocillo 3M ELISA requiere aproximadamente 2.5 mL de Solución de Lavado 1X.

**Nota:** Se puede producir la formación de cristales en la Solución de Lavado 3M (20X) cuando se la almacena a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C. Para disolver los cristales, caliente la Solución de Lavado 3M (20X) a una temperatura de entre 30 °C y 35 °C en un baño de agua o incubadora antes de preparar la Solución de Lavado (1X).

- **3M Conjugado de Pescado HRP:**

Para preparar el Conjugado de Pescado HRP 1X, añada una parte del Conjugado de Pescado HRP 3M (10X) y dilúyalo en 9 partes de la Solución Diluyente 1X. Prepárelos inmediatamente antes de su uso. Cada Pocillo ELISA 3M requiere 100 µL de Conjugado de Pescado HRP 1X.

### 4.3.3 Preparación de la muestra.


Todas las muestras se deben extraer con Solución Amortiguadora de Extracción 1X precalentada a una temperatura de entre 50 °C y 60 °C.

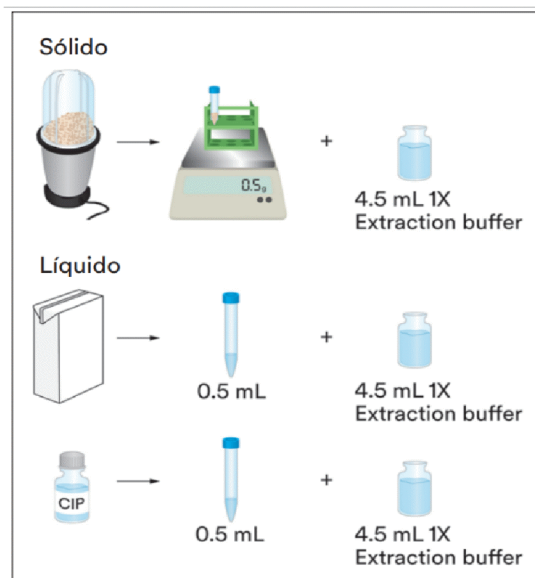
#### 4.3.3.1 Extracción de muestras

Prepare la muestra para la extracción de proteína en un tubo de ensayo limpio o en un tubo desechable, como se describe en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Preparación de la muestra para la determinación de alérgenos de pescado.


Matriz de la muestra	Tamaño de la muestra	Dilución (1/10)
Alimentos sólidos	0.5 g ± 0.02 g	Añada 4.5 mL ± 0.09 mL de Solución Amortiguadora de Extracción 1X precalentada
Alimentos líquidos	0.5 mL ± 0.01 mL	Añada 4.5 mL ± 0.09 mL de Solución Amortiguadora de Extracción 1X precalentada
Agua de lavado final de la limpieza in situ (CIP)	0.5 mL ± 0.01 mL	Añada 4.5 mL ± 0.09 mL de Solución Amortiguadora de Extracción 1X precalentada

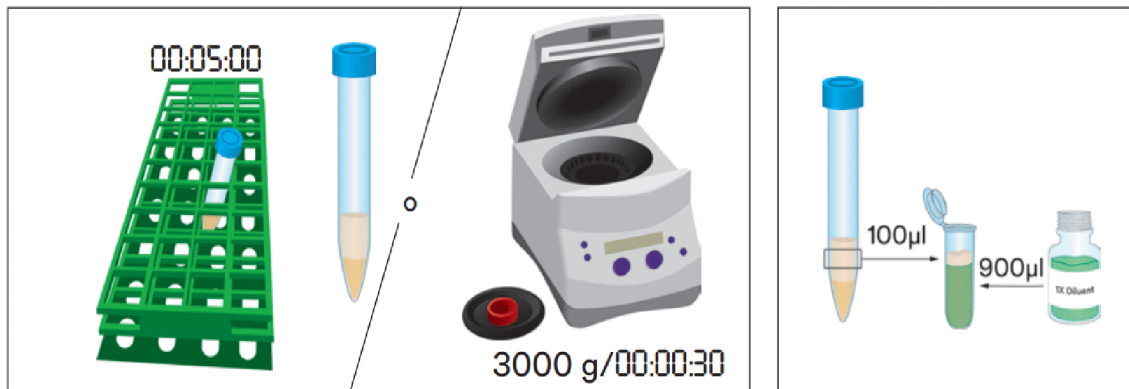
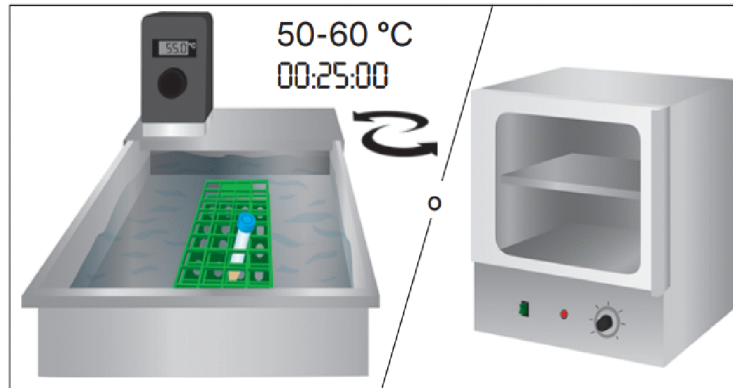
	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>



**Esquema 1.** Procedimiento de preparación de la muestra.

- 4.3.3.1.1. Incube las muestras diluidas en un baño de agua con agitación o en una incubadora con agitación a una temperatura de entre 50 °C y 60 °C durante 25 minutos  $\pm$  1 minuto. Otra opción es dejar las muestras en un baño de agua o incubadora a una temperatura de entre 50 °C y 60 °C y agitarlas manualmente durante 1 minuto cada 5 minutos.
- 4.3.3.1.2. Después de la incubación, centrifugue las muestras a entre 5000 RPM y 7000 RPM durante 20 o 30 segundos para disolver las partículas, o permita que se asienten durante 5 minutos en un soporte para tubos de ensayo.
- 4.3.3.1.3. Tome 100  $\mu$ L de la capa media (acuosa) y añádalos a 900  $\mu$ L de la Solución Diluyente (1X). Use un generador de vórtice o agite para mezclarlo bien. (Esto corresponde a una dilución 1/100 de la muestra original).

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión:</b> 1
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>




*Esquema 2. Procedimiento de preparación de la muestra.*

#### 4.3.3.2 Implementación del kit de ensayo

- 4.3.3.2.1. Retire un Pocillo 3M ELISA por muestra o estándar y coloque los pocillos en el soporte. Vuelva a colocar los pocillos 3M ELISA que no fueron utilizados en la bolsa metálica, vuelva a sellarla y guárdela a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.
- 4.3.3.2.2. Utilizando el Concentrado Estándar para Proteína de Pescado 3M, prepare un conjunto de cuatro estándares diluidos en la Solución Diluyente (1X).

**Tabla 4.** Preparación de los estándares para la determinación de alérgenos de pescado.

Número del Estándar	Concentración del Estándar (ng/mL)	Volumen del estándar agregado al Diluyente 1X	Volumen de la solución Diluyente 1X
4	270	10 µL del Concentrado Estándar de Proteína de Pescado 3M	990 µL
3	90	200 µL del estándar número 4	400 µL
2	30	200 µL del estándar número 3	400 µL
1	10	200 µL del estándar número 2	400 µL
0	0	0	400 µL

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>

4.3.3.2.3. Pipetee 100 µL de cada estándar en Pocillos 3M ELISA.

- Estándar 0 (Solución Diluyente 1X)
- Estándar 1 (10 ng/mL) ppb
- Estándar 2 (30 ng/mL) ppb
- Estándar 3 (90 ng/mL) ppb
- Estándar 4 (270 ng/mL) ppb

4.3.3.2.4. Pipetee 100 µL de la muestra extraída preparada en 1.4 en un Pocillo 3M ELISA.

4.3.3.2.5. Incube los pocillos 3M ELISA en un agitador orbital configurado a 400 rpm a temperatura ambiente (entre 20 °C y 25 °C) durante 30 minutos ± 2 minutos. Mantenga los pocillos cubiertos y nivelados durante este paso para evitar la evaporación.

4.3.3.2.6. Después de la incubación, aspire el contenido de los Pocillos 3M ELISA.

4.3.3.2.7. Llène por completo cada Pocillo 3M ELISA con Solución de Lavado 1X y aspirela. **Si el lavado se hace manualmente**, invierta la placa y viértala/agítela para extraer el contenido en un recipiente para desechos y de le un golpe seco a los pocillos contra papel absorbente para eliminar la solución de lavado residual. Repita este paso tres veces para completar un total de cuatro lavados.

4.3.3.2.8. Pipetee 100 µL de Conjugado de Pescado HRP 1X en cada Pocillo 3M ELISA. Incube en un agitador orbital configurado a 400 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos ± 2 minutos. Durante este paso, conserve la placa cubierta en la oscuridad y nivelada.


4.3.3.2.9. Llène por completo cada Pocillo 3M ELISA con Solución de Lavado 1X y aspirela. **Si el lavado se hace manualmente**, invierta la placa y viértala/agítela para extraer el contenido en un recipiente para desechos y de le un golpe seco a los pocillos contra papel absorbente para eliminar la solución de lavado residual.

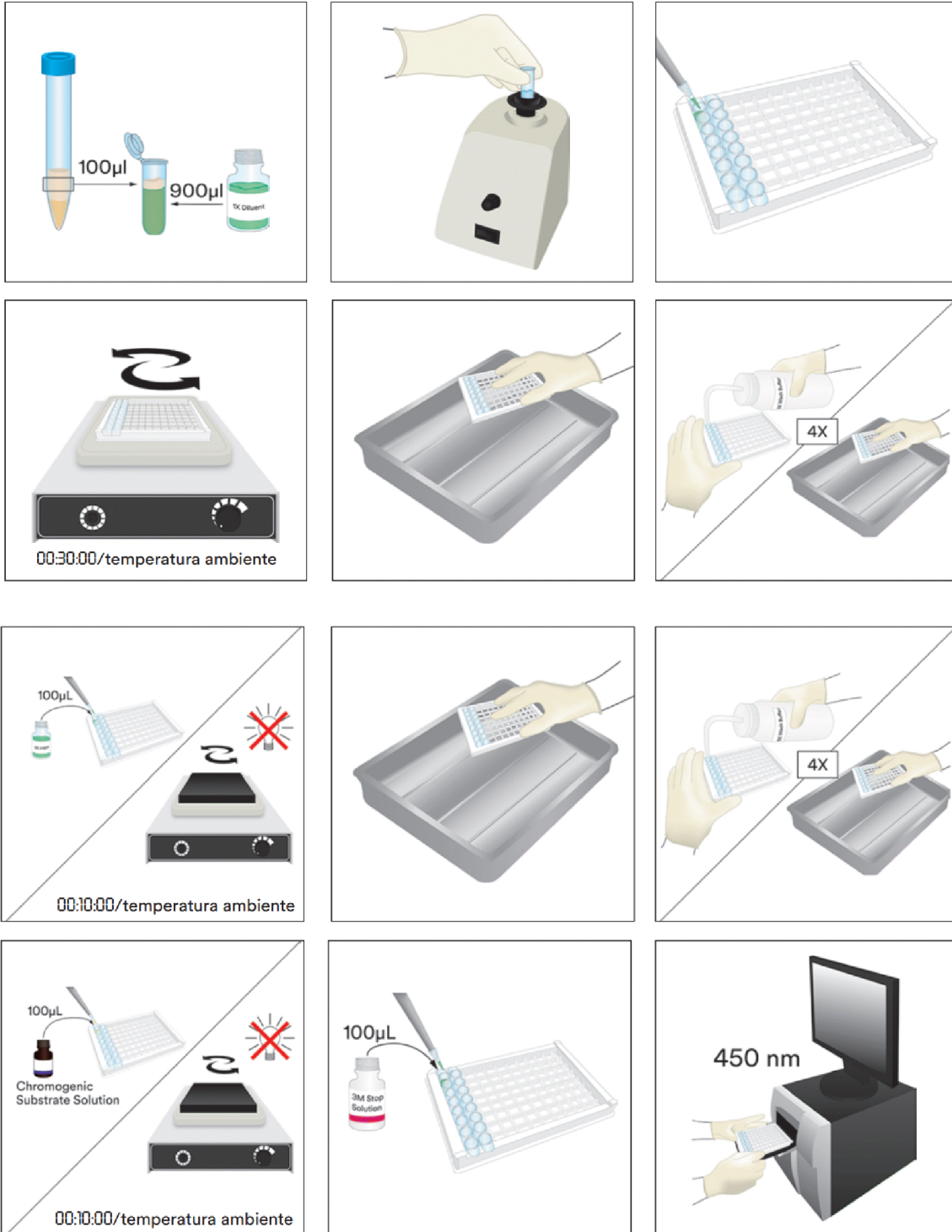
4.3.3.2.10. Repita los pasos 4.3.3.2.8 y 4.3.3.2.9. para completar un total de cuatro lavados con la Solución de Lavado (1X).

4.3.3.2.11. Pipetee 100 µL de la Solución de Sustrato Cromogénico 3M (TMB) en cada Pocillo 3M ELISA.

4.3.3.2.12. Incube en un agitador orbital configurado a 400 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Durante este paso, conserve la placa cubierta en la oscuridad y nivelada.

4.3.3.2.13. Después de la incubación, añada 100 µL de la 3M Solución de Paro en cada Pocillo 3M ELISA y determine la absorbancia (a 450 nm) en un plazo de 30 minutos.

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>



*Esquema 3. Procedimiento de implementación del kit*

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-209</b>
		Revisión: <b>1</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-09-11</b>

#### 4.3.4 Resultados.

##### 4.3.4.1 Cálculos

Teniendo las absorbancias arrojadas por el espectrofluorímetro en el protocolo de lectura realice los siguientes cálculos en el SOFT-TC-156 "Cuadro de mando para la determinación de alérgenos de pescado" y continuar con la trazabilidad del procedimiento descrito.

- 4.3.4.1.1. Reste el valor de fondo promedio para cada muestra. (Lectura promedio de absorbancia de la muestra menos la lectura de absorbancia promedio del estándar cero).
- 4.3.4.1.2. Usado un software informático capaz de generar un ajuste curvilíneo logístico de cuatro parámetros, **trace una curva estándar representando la concentración en ng/mL (ppb) en el eje X y la lectura de absorbancia para cada estándar correspondiente en el eje Y.** También se podría utilizar un ajuste curvilíneo polinómico de segundo orden (cuadrático) o de otro tipo. Sin embargo, sería un ajuste menos preciso de los datos.
- 4.3.4.1.3. Calcule las concentraciones de la muestra de la curva estándar; la unidad resultante es ng/mL (ppb). Luego, multiplíquelo por el factor de dilución de la muestra para obtener la concentración de la muestra original. Por ejemplo, si la dilución total de la muestra es 1/100 y la concentración de muestra de la curva estándar es 200 ng/mL (ppb), la concentración final de la muestra es  $200 \text{ ng/mL} \times 100 = 20\,000 \text{ ng/mL (ppb)}$  que es  $20 \text{ } \mu\text{g/mL (ppm)}$ .

**NOTA:** En la apertura del kit se realizará la curva de calibración completa, luego, se realizará montajes con un blanco y un duplicado por montaje. Además, en el cuadro de mando de deberá de ingresar la información detallada del kit en uso.


##### 4.3.4.2 Limitaciones del método

3M no documentó el uso de este producto en otras industrias que no sean la alimentaria o la de bebidas. Por ejemplo, 3M no documentó este producto para el análisis de muestras clínicas, veterinarias, cosméticas o farmacéuticas. No se evaluó el Kit ELISA para Proteína de Pescado 3M con todos los posibles productos alimenticios, procesos de alimentos y protocolos de prueba.

##### 4.3.4.3 Aseguramiento de calidad

Los resultados se registran de la siguiente manera:

Los datos serán registrados en el formato FOR-TC-189 "Formato de registro de datos primarios para la determinación de alérgenos de pescado en alimentos por inmunoensayo enzimático cuantitativo", se llevará la trazabilidad de todos los registros en el cuadro de mando SOFT-TC-156 "Cuadro de mando para la determinación de alérgenos de pescado."

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>

Los resultados serán guardados en la carpeta L:\LABORATORIO\REGISTROS\REGISTROS RT\Cuadros de Mando\Cuadros de Mando AÑO \ALÉRGENOS\PESCADO 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-XXX-mes-día-LX”.
- Carpeta “Reportes Gen 5”: guardar archivo de las absorbancias en formato PDF con el siguiente nombre “ES-año-XXX-mes-día-LX”.

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.

### 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.

### 5.3 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

	<b>Procedimiento de ensayo para la determinación de alérgenos de pescado por inmunoensayo enzimático cuantitativo</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-209</b>
		<b>Revisión: 1</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-11</b>

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-189 "Formato de registro de datos primarios para la determinación de alérgenos de pescado en alimentos por inmunoensayo enzimático cuantitativo"

SOFT-TC-156 "Cuadro de mando para la determinación de alérgenos de pescado." ]

#### 7. ANEXOS.

[Kit ELISA para Proteína de Pescado  
[34872831234 Trim.pdf \(neogen.com\)](https://www.neogen.com/34872831234-Trim.pdf) ]