

	<b>PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA</b>		
	<b>INSTRUCTIVO PARA TÉCNICA DE ELISA EN DETERMINACIÓN DE TETRACICLINAS EN CARNE, HÍGADO Y RIÑÓN</b>		
	<b>Código:</b> IN-GAA-165	<b>Versión:</b> 01	<b>Fecha de aprobación:</b> 18/03/2019

### 1. Objeto.

Documentar un instructivo guía estandarizado en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria Universidad de los Llanos para determinación de residuos de tetraciclinas en tejidos frescos carne, hígado y riñón con un kit comercial.

### 2. Alcance.

El presente instructivo aplica para el procedimiento de determinación de tetraciclinas en leches crudas por técnica de ELISA, ajustado a las recomendaciones de la casa comercial r-biopharm con el kit RIDASCREEN® *Tetracyclin.*; siguiendo un paso a paso que busca garantizar la confiabilidad de los resultados de posibles residuos de tetraciclinas en muestras de músculo, hígado y riñón en fresco destinados al consumo humano, como un recurso en la vigilancia de residuos de uno de los antimicrobianos con importancia en salud pública.

### 3. Referencias normativas.

- **Decreto 1500 de 2017**, “*Por el cual se establece el reglamento técnico a través del cual se crea el Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne, Productos Cárnicos Comestibles y Derivados Cárnicos, destinados para el Consumo Humano y los requisitos sanitarios y de inocuidad que se deben cumplir en su producción primaria, beneficio, desposte, desprese, procesamiento, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación. Ministerio de protección social*”
- **Resolución 0001382 de 2013**, “*Por la cual se establecen los límites máximos para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal destinados al consumo humano*”.
- **NTC – ISO/ IEC 17025:2005**, *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.*

### 4. Definiciones.

- **Antimicrobiano:** designa una sustancia natural, semisintética o sintética, que da muestras de actividad antimicrobiana (mata o inhibe el desarrollo de microorganismos) en concentraciones alcanzables in vivo. Se excluyen de esta definición los antihelmínticos y las sustancias clasificadas en la categoría de los desinfectantes o los antisépticos.
- **Bioseguridad:** designa un conjunto de medidas físicas y de gestión diseñadas para reducir el riesgo de introducción, radicación y propagación de las enfermedades, infecciones o infestaciones animales hacia, desde y dentro de una población animal.
- **Laboratorio:** designa una institución debidamente equipada y dotada de personal técnico competente que trabaja bajo el control de un especialista en métodos de diagnóstico veterinario, el cual es responsable de la validez de los resultados.
- **Vigilancia:** designa las operaciones sistemáticas y continuas de recolección, comparación y análisis de datos zoonosológicos y la difusión de información en tiempo oportuno para tomarse medidas.

### 5. Condiciones generales.

- Los tejidos carne, hígado y riñón, deben cumplir las condiciones especificadas en el instructivo IN-GAA-164.
- El Kit comercial RIDASCREEN® *Tetracyclin* que se utilice en la realización de la prueba debe contar con fechas de vencimiento vigentes.
- Es necesario que el personal que intervenga en la realización de la prueba disponga de elementos de protección personal y medidas de bioseguridad para manipular muestras biológicas.
- Se requiere contar con equipos calibrados, para garantizar la confiabilidad de los resultados.

## 6. Desarrollo.

### RIDASCREEN® Tetracyclin



**Art. No. R3505**

### ELISA PARA CARNE, HIGADO Y RIÑÓN

#### 6.1 Preparación de las muestras de carne, hígado y riñón.

1. Para las muestras que están congeladas, dejar con 5 horas de anticipación en refrigerador esperando que ocurra su total descongelación.
2. En un procesador o picadora de carne, macerar totalmente la muestra de carne, hígado o riñón asegurándose que esta quede en partículas muy pequeñas y homogéneas. Entre muestra y muestra se debe tener especial cuidado en la limpieza para no contaminar la muestra final.

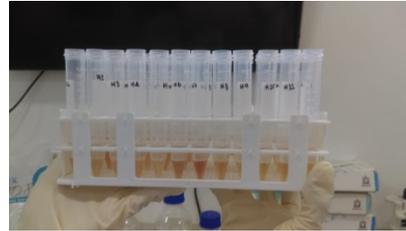


3. Pesar un (1) gramo de cada muestra y dispensar el gramo de muestra en tubo cónico plástico de 15 ml, debidamente identificados con tipo de muestra y número de registro del tejido a evaluar.
4. Pipetear nueve (9) ml de Buffer PVS de Ph 7, 4 en cada tubo con la muestra.
5. Llevar al vortex y homogeneizar durante 10 segundos



6. Poner los tubos en un agitador por 10 minutos
7. Centrifugar a 400 Rpm por 10 minutos.
8. Pipetear un (1) ml del sobrenadante de cada muestra y colocar en un tubo cónico de 15 ml, luego agregar 2 ml de hexano en el tubo con el sobrenadante.
9. Los tubos del sobrenadante + Hexano se deben llevar al vortex por 10 segundos, centrifugar por 10 minutos a 4000 Rpm.

10. Pipetear 50 µl de la fase acuosa del fondo de los tubos en un Ependoff.



## 6.2 Protocolo técnica Elisa kit comercial Ridascreen® Tetracyclin carnes

### 6.2.1 Preparación de Buffer de lavado y estándar

#### Buffer de lavado

Preparación del Buffer de Lavado: Diluir 1000 ml de agua destilada con el sobre de kit para preparado; homogeneizar lentamente para no generar espuma. Dispensar en un frasco lavador listo para utilizar.



#### Preparación de los Estándar

1. Estándar 1: Adicionar 50 µl *Standard #1* de 0 µg/L y 450 µl de Buffer 1 para carnes en un Ependoff y homogeneizar por 10 segundos en el vortex.
2. Estándar 2: Adicionar 50 µl *Standard #2* de 0.5 µg/L y 450 µl de Buffer 1 para carne en un Ependoff y homogeneizar por 10 segundos en el vortex.
3. Estándar 3: Adicionar 50 µl *Standard #3* de 1.5 µg/L y 450 µl de Buffer 1 para carne en un Ependoff y homogeneizar por 10 segundos en el vortex.
4. Estándar 4: Adicionar 50 µl *Standard #4* de 3 µg/L y 450 µl de Buffer 1 para carne en un Ependoff y homogeneizar por 10 segundos en el vortex.
5. Estándar 5: Adicionar 50 µl *Standard #5* de 6 µg/L y 450 µl de Buffer 1 para carne en un Ependoff y homogeneizar por 10 segundos en el vortex.
6. Estándar 6: Adicionar 50 µl *Standard #6* de 18 µg/L y 450 µl de Buffer 1 para carnes en un Ependoff y homogeneizar por 10 segundos en el vortex.



### 6.2.2 Montaje de la Placa

Llenar la planilla de la placa identificando las muestras y los estándar que se servirán en cada pozo en consideración en cada columna de la microplaca.

- Pipetear 50  $\mu$ l de los estándar en los pozos registrados
- Pipetear 50  $\mu$ l de la muestra en el pozo registrado, hasta servir todas las muestras debidamente registradas.
- Adicionar 50  $\mu$ l del anticuerpo (*Antibody* del Kits) en todos los pozos y homogeneizar suavemente la placa sobre la superficie de trabajo
- Dejar la micoplaca a temperatura de 21°C a 24°C por una hora.



### 6.2.3 Primer Lavado de placa (Manual)

- Vaciar fuertemente el contenido de la placa, con el fin de eliminar el líquido de cada pocillo.
- Culminar el vaciado golpeando la placa fuertemente sobre una superficie plana de trabajo, con papel absorbente para retener y asegurar el vaciado.
- Disponer suficiente Buffer de lavado verificando que todos los pozos rebocen con Buffer, sin que se formen burbujas pues esta no dejan lavar bien el fondo de los pozos, vaciar todo el contenido; después golpear la microplaca sobre papel absorbente en la superficie plana de trabajo, comprobar que no salgan más fluido de lavado residual de la placa.
- Evitar que las placas se sequen entre los lavados, si se demora mucho.
- Repetir el lavado con el buffer por cinco (5) veces.



### 6.2.4 Adición del conjugado

- Dispensar a los pozos 100  $\mu$ l de *conjugado*
- Homogeneizar levemente la placa, sobre una superficie plana.
- Dejar a temperatura ambiente por 15 minutos.



### 6.2.5. Segundo Lavado de placa (Manual)

Repetir el lavado tal como se realizó el primer lavado con el Buffer por cinco (5) veces. Verificar que la microplaca quede libre de excesos de solución de lavado.

### 6.2.6. Adición del Chromogeno/ sustrato y Stop

- Pipetear 100  $\mu$ l de *Red Chromogen Pro* en cada pocillo de la microplaca.
- Homogeneizar levemente, la placa sobre una superficie plana.
- Dejar incubar en reposo la placa durante 15 minutos protegido de la luz, a una temperatura 18 °C – 26 °C.

d) Pipetear 100 µl de *Stop solution* en cada pozo.

Llevar al lector, con una densidad óptica 450/630 nm. Tiempo máximo para la lectura es de 30 minutos, se aconseja que la lectura sea inmediata.



### 6.2.7 Lectura de la Placa

- Llevar la placa al lector de ELISA.
- Ubicar los Estándar en el Software según la planilla que se llenó previamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P9	P17	P25	P33	Std1	BLK	P45	P53	P61	P69	P77
B	P2	P10	P18	P26	P34	Std2	BLK	P46	P54	P62	P70	P78
C	P3	P11	P19	P27	P35	Std3	BLK	P47	P55	P63	P71	P79
D	P4	P12	P20	P28	P36	Std4	BLK	P48	P56	P64	P72	P80
E	P5	P13	P21	P29	P37	Std5	P41	P49	P57	P65	P73	P81
F	P6	P14	P22	P30	P38	Std6	P42	P50	P58	P66	P74	P82
G	P7	P15	P23	P31	P39	BLK	P43	P51	P59	P67	P75	P83
H	P8	P16	P24	P32	P40	BLK	P44	P52	P60	P68	P76	P84
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
G	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

- Ubicar las muestras en el Software según planilla que se llenó previamente.

### 7. Flujograma.

No aplica

### 8. Listado de anexos.

Hoja de plantilla para microplacas de ELISA para 96 pozos.

### 9. Documentos de referencia

Para este instructivo no se generan documentos de referencia.

### 10. Historial de Cambios:

Versión	Fecha	Cambios	Elaboró / Modificó	Revisó	Aprobó
01	18/03/2019	Documento Nuevo	Leidy Vargas Montoya Prof. de Apoyo	José Fernández Co investigador	Gina Lorena García Investigador principal