

### 1. Objeto.

Documentar un instructivo guía estandarizado en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria Universidad de los Llanos para determinación de residuos de tetraciclinas en leche cruda con un kit comercial.

### 2. Alcance.

El presente instructivo, está diseñado con el fin de disponer de una guía estandarizada para uso en laboratorio, 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 leche cruda para consumo humano, como un recurso en la vigilancia de residuos de uno de los antimicrobianos con importancia en salud pública..

### 3. Referencias normativas.

- **Decreto 1880 de 2011**, “Por el cual se señalan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el territorio nacional”.
- **Decreto 616 de 2006**, “Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendi, importe o exporte en el país”.
- **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.
- **Leche:** Es el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior.
- **Leche cruda:** Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de terminación ni higienización.
- **Vigilancia:** designa las operaciones sistemáticas y continuas de recolección, comparación y análisis de datos zoonosanitarios y la difusión de información en tiempo oportuno para tomarse medidas.

### 5. Condiciones generales.

- Las muestras de leche cruda, deben cumplir con las condiciones especificadas en el instructivo IN-GAA-166.
- 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 LECHE

### 6.1 Preparación de la muestra de leche.

1. Las muestras deben estar a 10°C.
2. Centrifugar a 4000 Rpm por 10 minutos.
3. Extraer la grasa sobrenadante de cada una de las muestras, con una pipeta Pasteur. Esto con el fin de desnatar.
4. Centrifugar nuevamente a 4000 Rpm por 10 minutos.
5. Pipetear de la parte media del tubo 50 µl de leche en un tubo Ependof.
6. Adicionar 450 µl de Buffer 2 del kit.
7. Homogeneizar la muestra en el vortex por 10 segundos

Para el montaje en la microplaca del kit; se diseñó una planilla en hoja de papel para graficar la posición de cada estándar y la muestra en el respectivo pozo o pocillo de la placa en cada columna de la microplaca.

### 6.2 Protocolo técnica Elisa kit comercial Ridascreen® Tetracyclin EN LECHE

#### 6.2.1 Preparación de Buffer de lavado y estándar

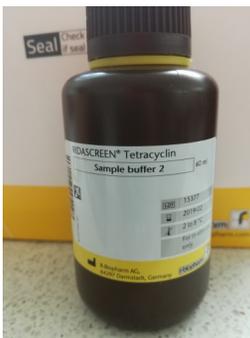
##### Buffer de lavado

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.

##### Estándar

Con el kit ya debidamente atemperado de 18°C – 26°C iniciar el proceso de preparación de los seis estándar que contiene este kit.

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



- Estándar 6: Adicionar 50 µl *Standard #6* de 18 µg/L y 450 µl de *Sample Buffer 2* para leche en un Ependoff y homogeneizar por 10 segundos en el vortex.



### 6.2.2 Montaje de la Placa

- Pipetear 50 µl de los estándares en cada pocillo registrados
- Pipetear 50 µl de la muestra en el pocillo registrado, hasta servir todas las muestras debidamente asignados en la planilla. Un pocillo por muestra
- Adicionar 50 µl del anticuerpo (*Antibody* del Kits) en todos los pozos y homogeneizar suavemente la microplaca sobre la superficie plana de trabajo
- Dejar la placa 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 estas 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

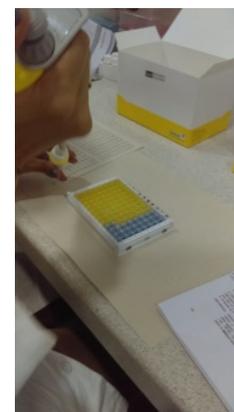
- Dispensar a cada pocillo 100 µl de *Conjugate*.
- Homogeneizar levemente la placa sobre una superficie plana de trabajo.
- Dejar a temperatura ambiente por 15 minutos.

### 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.

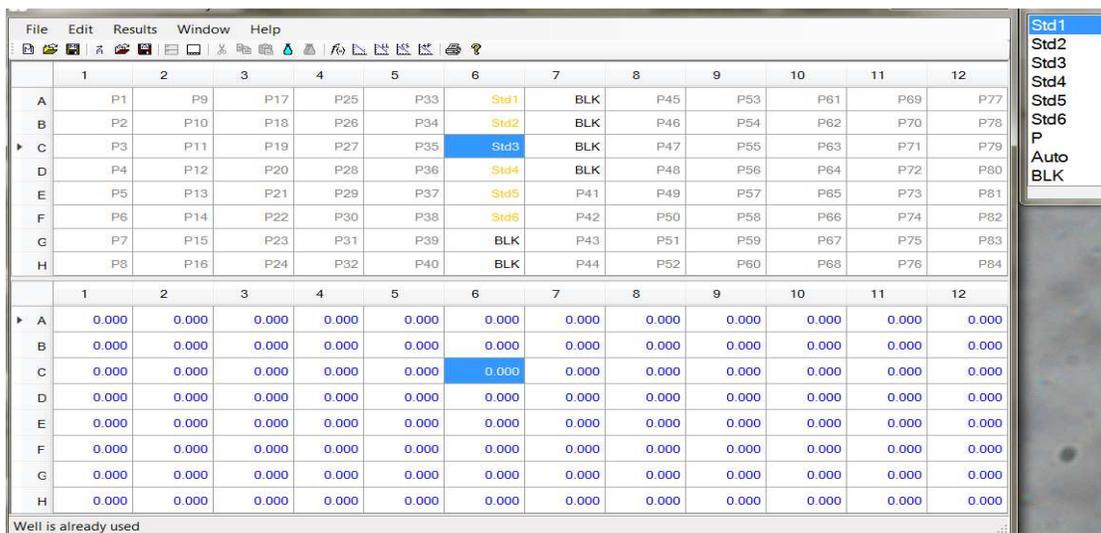
### 6.2.6 Adición del Chromogeno/ sustrato y Stop

- Pipetear 100 µl 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.
- Pipetear 100 µl de *Stop solution* en cada pocillo.
- 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.
- Ubicar las muestras en el Software según 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

### 7. Flujoograma.

No aplica

### 8. Listado de anexos.

Este documento no tiene anexos.

### 9. Documentos de referencia

Para este instructivo no se tienen que generar documentos de referencia.

### 10. Historial de Cambios:

Versión	Fecha	Cambios	Elaboró / Modificó	Revisó	Aprobó
01	12/03/2019	Documento Nuevo	Leidy Vargas Montoya	José Fernández	Gina Lorena García