

## **Legipid<sup>®</sup> Legionella Fast Detection**

Referencia:  
*311-10-04*

### **Prospecto**

Test para la detección rápida de *Legionella spp* en muestras de agua, basado en la combinación de la captura inmunomagnética y el inmunoensayo enzimático (CEIA).

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

II. TECNOLOGÍA DEL TEST Legipid® Legionella Fast Detection

III. REACTIVOS Y COMPONENTES DEL KIT

IV. CADUCIDAD Y ALMACENAMIENTO

V. MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

VI. PRECAUCIONES Y RECOMENDACIONES

VII. PROTOCOLO

A. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

B. ANÁLISIS

C. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DEL TEST

VIII. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS

IX. CARACTERÍSTICAS Y VALIDACIÓN DEL TEST

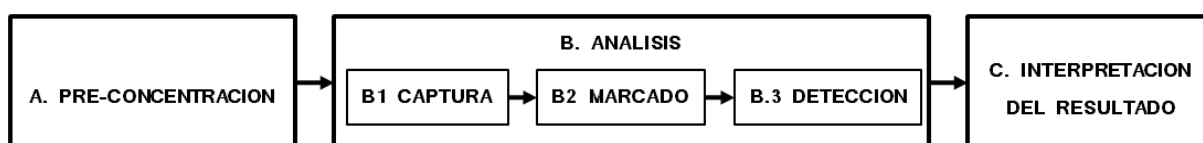
X. REFERENCIAS

## I. INTRODUCCIÓN

**Legipid® Legionella Fast Detection (Cat. No. 311-10)** es un test sencillo y rápido para la detección presuntiva de *Legionella sp* en agua potable, natural e industrial. El test combina inmunocaptura magnética y enzimo-inmunoensayo (CEIA) con reacción colorimétrica enzimática para un ensayo rápido de 1 hora, después de pre-concentrar una muestra.

## II. TECNOLOGÍA DEL TEST Legipid® Legionella Fast Detection

La muestra original de agua se concentra por filtración o similar, y esta muestra preparada se eluye y dispensa en una cubeta, para ser analizada por el método CEIA. Se añade una suspensión de partículas magnéticas que se unen a *Legionella*. Si hay presentes células de *Legionella* en la muestra preparada, se unirán a los anticuerpos inmovilizados en las partículas magnéticas para formar complejos bacteria/partícula. Como estos complejos pueden separarse por un imán, son fácilmente lavados y resuspendidos. Los complejos se incuban con un anticuerpo anti-*Legionella* conjugado con una enzima, para formar complejos marcados. Tras los lavados, los complejos *Legionella*/partícula se visualizan por colorimetría, cuando se añaden los substratos enzimáticos. Este test incluye las siguientes 3 etapas principales:



## III. REACTIVOS Y COMPONENTES DEL KIT

La referencia **311-10-04 (100 tests)** contiene los elementos indicados en la siguiente tabla:

Reactivo/componente	ID	Cantidad
Eluyente	L0	1 frasco (1050 mL)
Reactivo de captura (partículas inmunomagnéticas)	L1	1 frasco ( 105 mL)
Tampón de lavado	L2	2 frasco (2 X 940 mL)
Anticuerpo anti- <i>Legionella</i> conjugado con enzima	L3	1 frasco (105 mL)
Co-substratos enzimáticos	L4	35 tetra dosis (35 x 5 ml)
Reactivo de parada	L5	1 frasco (11 mL)
Cubeta	CB	100 unidades

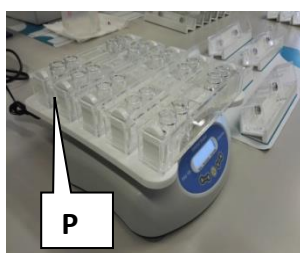
El concentrador **MP4-Hunter (311-MP4-00)** contiene los elementos listados en la siguiente tabla:

MP4-Hunter (ref. 311-MP4-00), 1 unidad		
Componente	ID	Cantidad
Soporte magnético para 4 cubetas	311-MP4-MH	5
Soporte Insertable para 4 cubetas	311-MP4-CH	5
Soporte de Sujeción	311-MP4-BB	5
Tapete posicionador(*)	311-MP4-TC	1
Plataforma(**)	311-MP4-P	1
Agitador Orbital(**)	311-MP4-AGT	1

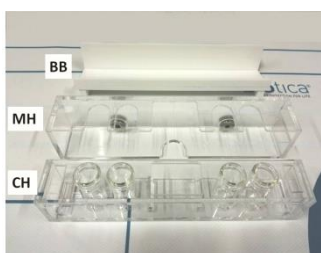
(\*) Evita la proximidad excesiva entre imanes. Si no está disponible, mantenga una distancia de al menos 12 cm entre concentradores. (\*\*) No se suministra si opta por la agitación manual durante el ensayo.



311-10 CB



311-MP4-00



Los componentes MH, CH y BB, pueden adquirirse como un conjunto separado bajo la referencia MP4-SP.

El montaje y desmontaje del concentrador es como se describe a continuación:

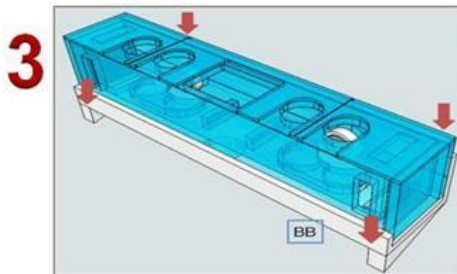
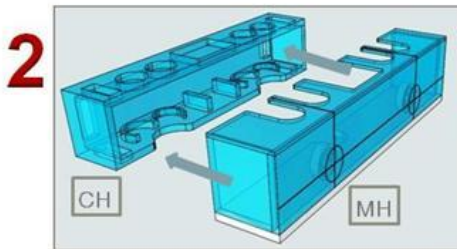
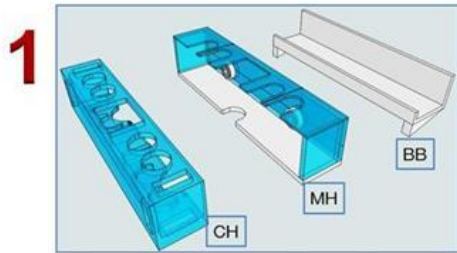
## ENSAMBLADO MP4

Inserte las cubetas en el soporte (CH). Introduzca cada soporte de cubetas (CH) en un soporte magnético (MH). Encaje el conjunto en su soporte de sujeción (BB) (presione ligeramente por delante y encájelo hacia abajo).

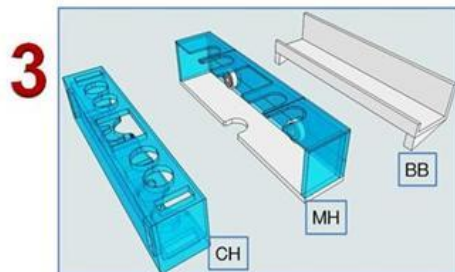
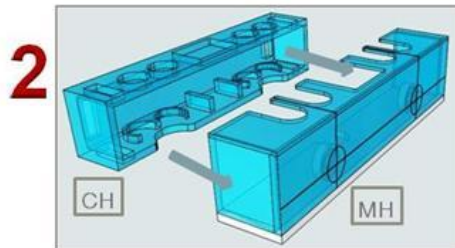
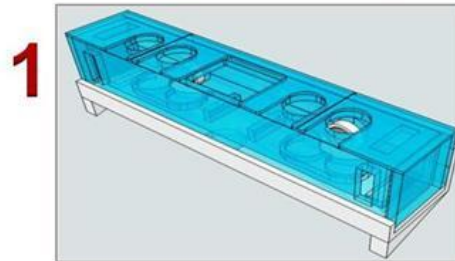
## DESMONTAJE MP4

Desencaje el soporte de sujeción (BB). Separe el soporte de cubetas (CH) del soporte magnético (MH).

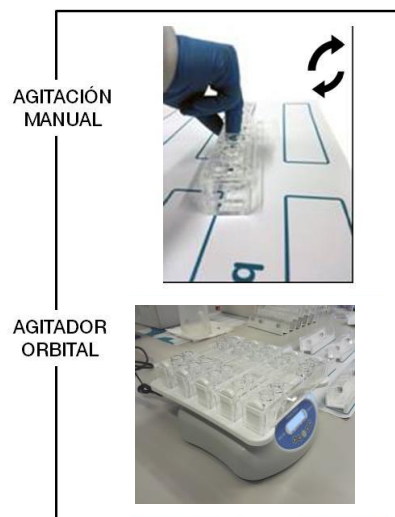
### ENSAMBLAR MP4



### DESMONTAR MP4



El soporte con las cubetas insertadas (CH) puede agitarse manualmente sobre tapete (311-MP4-TC) o bien utilizando un agitador orbital (311-MP4-AGT).



#### IV. CADUCIDAD Y ALMACENAMIENTO

Una vez recibido, el kit se almacena entre +2°C y +8°C, preferiblemente a +4°C. La caducidad de los reactivos, correctamente almacenados, es de **5 meses** desde la **fecha de fabricación**. Todos los reactivos incluyen su propio número de lote y condiciones de almacenamiento. Dichas condiciones también se encuentran en el embalaje. Además, el protocolo incluye código, número de lote y fecha de caducidad, asegurando la trazabilidad de todos los reactivos. Puede solicitar al fabricante un certificado de análisis.

#### V. MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Frasco graduado con tapón de rosca, para la elución del filtro.
- Filtro de fibra de vidrio, diámetro de poro 2.7µm, para uso como pre-filtro (\*).
- Filtro de membrana, diámetro de poro 0.4µm en el caso de filtros de policarbonato (\*\*).
- Contenedor para residuo.
- Pipetas de 10-100µl, 100-1000µl y 1-5ml.
- Aparato de filtración (\*\*\*), para pre-concentrar muestras de agua por filtración de membrana.
- Opcional: Cubetas semimicro para lectura en espectrofotómetro (ref.511-10-04, caja 100 u).
- Opcional: Primelab (ref. 911-10-PL).
- Opcional: vórtex o sonicador, para eluir el filtro (la elución puede hacerse manual).

(\*El uso de un filtro de fibra de vidrio de 2,7 micras de tamaño de poro como pre-filtro para las muestras de agua se recomienda solo para la filtración de muestras muy sucias. (\*\*Es posible un diámetro de poro más pequeño, pero puede dificultar la filtración. (\*\*\*)Nota: Contáctenos para información detallada sobre equipos recomendados por nuestro departamento técnico

#### VI. PRECAUCIONES Y RECOMENDACIONES

- Este ensayo debe ser realizado por personal adecuadamente capacitado.
- Este ensayo está diseñado para las siguientes matrices: agua potable, natural e industrial.
- El producto es seguro en condiciones normales de uso. Evite el contacto con los ojos. Si se pudieran producir salpicaduras, use gafas de seguridad.
- Evite el contacto con la piel usando guantes. (Ver Ficha de Seguridad)
- Atención: Ciertos aislados no pueden ser detectados por debajo de 10<sup>6</sup> UFC.
- Productos estables. Es improbable que reaccionen peligrosamente en condiciones normales de uso.
- El producto debe ser desechado de acuerdo con la normativa vigente. Deseche los envases vacíos a través del proceso de reciclado o eliminación de residuos.
- Las prestaciones del ensayo dependen del estricto cumplimiento de las siguientes prácticas, especialmente en lo que concierne a la ejecución correcta del protocolo:
  - No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad.
  - Utilizar como control negativo el mismo eluyente (L0) utilizado en la preparación de la muestra (elución).
  - Utilizar un control negativo (reactivo L0) para cada tanda de de ensayos.
  - Dejar atemperar los reactivos (18-26 °C) al menos durante 30 minutos antes de su uso.
  - Agitar el reactivo L1 antes de usar, para la homogeneidad de las partículas magnéticas.
  - Ejecutar cuidadosamente las etapas de lavado (reactivo L2).
  - **Las cubetas son desechables. No reutilizar.**
- Dejar atemperar al menos durante 30 minutos las siguientes cantidades de reactivos por ensayo a realizar:
  - L0: 10 ml
  - L1: 1 ml (antes de tomar los ml pertinentes agitar el frasco original del reactivo L1 hasta obtener una suspensión completamente homogénea).
  - L2: 18 ml
  - L3: 1 ml
  - L4: cada frasco es para 4 ensayos.
  - L5: 0.1 ml
- **Los volúmenes atemperados no deben guardarse de nuevo en nevera. Desechar.**
- **Dejar atemperar la cantidad requerida de L3 protegida de la luz.**
- Utilizar el tapete posicionador (311-MP4-TC). Si no, mantenga entre concentradores una distancia de al menos 12 cm.
- Para muestras muy coloreadas: tras vaciar sobrenadantes, el módulo MP4 ensamblado puede inclinarse hacia delante hasta 45° para que el líquido residual escurra hasta el fondo de la cubetas inclinadas, en el lado opuesto a las partículas magnéticas retenidas. Esto permite eliminar ese líquido mediante pipeta.
- **Los reactivos son suministrados en exceso. No utilizar sobrantes de ningún reactivo. No mezclar lotes.**

## VII. PROTOCOLO

Se recomienda encarecidamente leer este protocolo con detenimiento antes de iniciar el test.

### A. Preparación de la muestra

1. Recoja el volumen de muestra del agua original que desea concentrar (por ejemplo por filtración).
2. Añada 10ml del eluyente en un frasco. Use como eluyente L0.
3. Filtre el volumen recogido utilizando un filtro de membrana (\*). Para muestras muy sucias, puede usar un pre filtro de fibra de vidrio de 2.7  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro situado sobre el filtro de membrana.

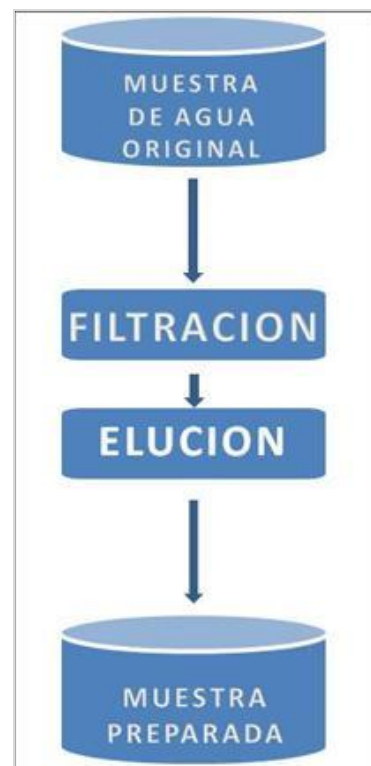
(\* ) se utilizó 0.4  $\mu\text{m}$  en la validación de AOAC



4. Cuidadosamente separe el filtro del sistema de filtración y deposítelo dentro del frasco con el eluyente preparado en el paso 2. Opcionalmente puede cortar el filtro en varias piezas con unas tijeras. Si también ha usado el pre filtro, por favor, retírelo y deséchelo.



5. Eluya el filtro por agitación. Esta agitación puede ser:
  - a. Manual (2 minutos)
  - b. Vórtex (2 minutos)
  - c. Baño ultrasonidos (5 minutos)



#### **Nota:**

Por cada tanda de muestras, se realizará un control negativo con el mismo reactivo eluyente utilizado (L0)

Protocolo basado en los contenidos de la norma estándar ISO 11731 para la detección y enumeración de *Legionella* en agua.

### La muestra eluída se denomina muestra preparada.

Para una recuperación óptima, agite esta muestra justo antes de su trasvase a la cubeta de análisis.

## **B. Análisis con el kit Legipid® Legionella Fast Detection**

### **Antes de comenzar el test:**

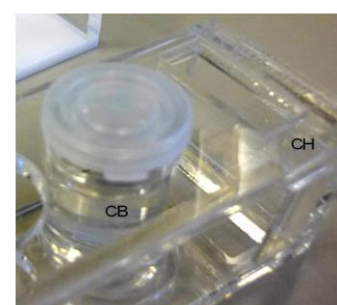
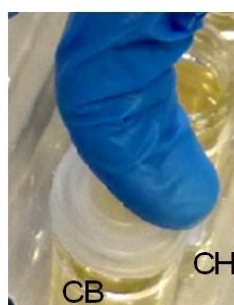
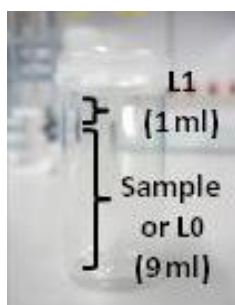
- ó **Sacar sólo las cantidades de reactivos necesarias y dejarlas 30 minutos a temperatura ambiente antes de su utilización.**
- ó Inserte las cubetas (CB) en su soporte (CH), tantas como muestras vaya a realizar y la del control.

**Si no tiene agitador (AGT) con plataforma (P):** manipule los CH manualmente sobre el tapete (TC).

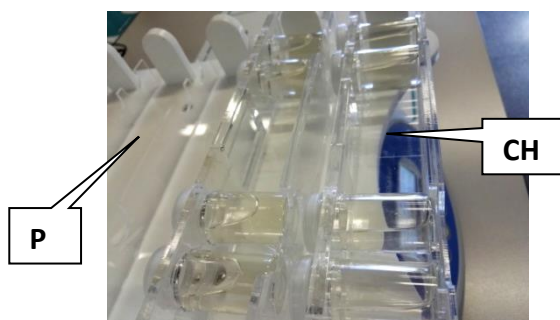
### **B.1) ETAPA DE CAPTURA**

**1.** Añada cada **muestra preparada (9 ml)** en su correspondiente cubeta (T). A continuación, añada **L0 (9 ml)** a la cubeta de control (C) (un control por tanda de ensayos). Aplique a todas las cubetas todos los pasos que siguen a continuación.

**2.** **Agite suavemente el L1 por inversiones repetidas, hasta obtener una suspensión completamente homogénea.** Resuspenda mediante *pipetting* suave y repetido, y entonces añada **1 ml** en cada cubeta. **COLOQUE LOS TAPONES** en las cubetas.



**3.** Inserte los soportes de cubetas (CH) en la plataforma (P), caso de tenerla, de modo que las cubetas **queden en posición horizontal**. Agite a **80 rpm** durante **15 minutos** en el agitador orbital (**manual: sobre el tapete agite en vaivén suave 3 veces cada 3 minutos**).

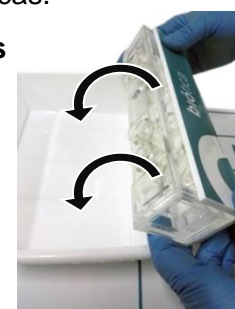


**4.** Retire los soportes de cubetas (CH) de la plataforma (P), caso de tenerla, y **QUITE LOS TAPONES Y DESÉCHELOS** (en posición vertical). Ensamble los MP4 (ver pág. 4) y colóquelos en su posición del tapete (TC). Espere **5 minutos** para retener las partículas magnéticas.

**5.** Deseche el sobrenadante vaciando las cubetas **por el lado opuesto a los imanes**, rotando para ello el conjunto.

**6.** Desensamble el MP4 e inserte el soporte de cubetas (CH) en posición vertical sobre la plataforma (P) en el agitador orbital (**manual: sobre el tapete**). Entonces añada **4.5ml del reactivo L2 en cada cubeta**.

**7.** Agite SIN TAPONES a **350 rpm** durante **10 segundos** (**manual: sobre el tapete agite en vaivén enérgico**) hasta resuspender las partículas.



**8.** Retire los soportes de cubetas (CH) de la plataforma (P) - caso de tenerla -, ensamble los MP4 y colóquelos en su posición del tapete (TC) y espere **3 minutos** para retener las partículas magnéticas.

**9.** Deseche el sobrenadante vaciando las cubetas **por el lado contrario a los imanes**, rotando el conjunto.

## B.2) ETAPA DE MARCADO

1. Desensamble los MP4 e inserte los soportes de cubetas (CH) en posición vertical sobre la plataforma (P) en el agitador orbital (**manual: sobre el tapete**). Añada **1 ml** de reactivo L3 en cada cubeta.

2. Agite SIN TAPONES a **250 rpm** durante **10 segundos** (**manual: sobre el tapete agite en vaivén energético**) y seguidamente a **80 rpm** durante **10 minutos** (**manual: vaivén suave cada 2 minutos durante 10 minutos**).

3. Separe los soportes de cubetas (CH) de la plataforma (P), caso de tenerla, y ensamble los MP4. Colóquelos en su posición del tapete (TC) y espere **3 minutos** para retener las partículas magnéticas.



4. Deseche el sobrenadante vertiendo **por el lado contrario a los imanes**, rotando el conjunto.

5. Desensamble los MP4 e inserte los soportes de cubetas (CH) en posición vertical sobre la plataforma (P) en el agitador orbital (**manual: sobre el tapete**). Entonces añada **4.5ml del reactivo L2 en cada cubeta**.

6. Agite a **350 rpm** durante **10 segundos** SIN TAPONES (**manual: sobre el tapete agite en vaivén energético**), hasta resuspender las partículas.

7. Separe los soportes de cubetas (CH) de la plataforma (P), caso de tenerla. Ensamble los MP4 y colóquelos en su posición del tapete (TC). Espere **3 minutos** para retener las partículas magnéticas.

8. **Repita los pasos 4, 5, 6 y 7 (de esta sección B.2 ETAPA DE MARCADO) dos veces más**

## B.3) ETAPA DE DETECCIÓN

1. Deseche el sobrenadante vertiendo **por el lado contrario a los imanes**, rotando el conjunto. Desensamble los MP4 e inserte los soportes de cubetas (CH) en posición vertical sobre la plataforma (P) en el agitador orbital (**manual: sobre el tapete**).

2. Prepare el reactivo L4 (un vial para cada 4 ensayos): desprecinte el tapón protector y retírelo. **Agite vigorosamente la mezcla durante 10 segundos**. Una vez que el reactivo L4 está preparado, debe utilizarse inmediatamente.



3. Abra el vial de L4 justo antes de usarlo. Para ello retire el obturador con el pistón insertado, aplicando una ligera presión lateral con el pulgar.

4. **Inmediatamente añada con pipeta 1 ml de L4 a cada cubeta**. Agite SIN TAPONES a **80 rpm** durante **2 minutos** (**manual: sobre el tapete en vaivén suave**). Empiece agitando a **250 rpm** durante los primeros **10 segundos** (**manual: vaivén energético**) hasta que las partículas se resuspendan.

(**Nota: cuente el tiempo desde la primera adición de L4**)

5. Pare de agitar. Añada **100 µl de L5** a todas y cada una de las cubetas y agite durante **5 segundos a 80 rpm** (**manual: sobre el tapete en vaivén suave**).

(**Nota: añada el L5 en el mismo orden en que añadió el L4**)



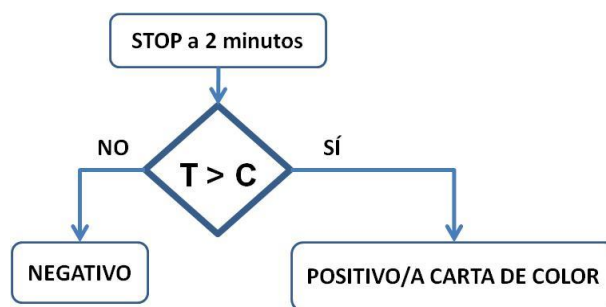
6. Separe los soportes de cubetas (CH) de la plataforma (P), caso de tenerla, y ensamble de nuevo los MP4. Espere **5 minutos** para retener las partículas magnéticas.



## C. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DEL TEST

### C.1. Interpretación Visual

La interpretación visual de los resultados del test se resume en el diagrama siguiente:

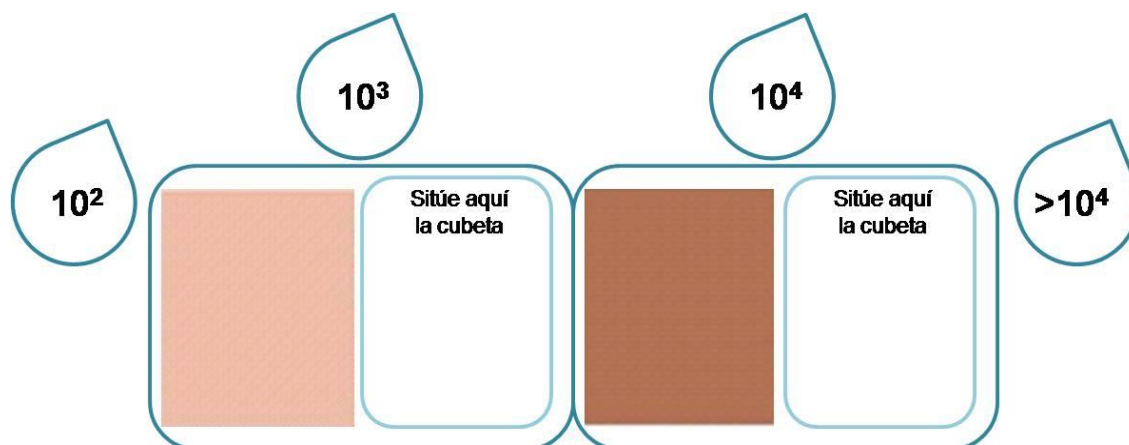


T: COLOR DEL TEST C: COLOR DEL CONTROL

**El resultado del test (T) se considera POSITIVO si** el test (T) presenta mayor color que el control (C) tras 2 **minutos** desde el inicio de la reacción colorimétrica. La estimación general del nivel de *Legionella sp* se puede obtener comparando el color del test (T) **con la carta de color**.

**Carta de Color** Sitúe la cubeta del test (T) junto a la siguiente carta de color.

Resultados en UFC equivalentes / volumen examinado



Por debajo del primer color de la carta: hasta dos órdenes de magnitud ( $10^2$  UFC<sub>eq</sub>/volumen examinado). Por debajo del segundo color de la carta: hasta tres órdenes de magnitud ( $10^3$  UFC<sub>eq</sub>/volumen examinado). A partir del segundo color de la carta: igual o mayor que cuatro órdenes de magnitud ( $10^4$  UFC<sub>eq</sub>/volumen examinado).

**El resultado del test (T) se considera NEGATIVO si** el test (T) no presenta diferencia de color con el control (C) transcurridos los **2 minutos** desde el inicio de la reacción colorimétrica.

### C.2. Lectura óptica

**(1)** Trasvase 1ml de los sobrenadantes Control (C) y Test (T), cada uno a su correspondiente celda de lectura. *Nota importante: Tome con pipeta 1ml del sobrenadante desde el lado opuesto al imán, cuidando así de no arrastrar las partículas retenidas por el imán.*

**(Si dispone de un equipo Primelab, siga sus instrucciones; si utiliza otro colorímetro, continúe con los siguientes pasos)**

**(2)** Mida la absorbancia a 429 nm en una celda llena de agua destilada. Ajuste la absorbancia a cero.

**(3)** Mida la absorbancia a 429 nm del sobrenadante del control (C), como referencia. Ajuste de nuevo la absorbancia a cero.

**(4)** Mida la absorbancia del sobrenadante de cada test (T). Lea inmediatamente: siempre dentro de los 10 minutos transcurridos desde el final de la reacción colorimétrica.

*Nota: Si el paso de celda de lectura no es 1 cm, la corrección correspondiente es necesaria. Siga las instrucciones del fabricante de su lector óptico.*

**Resultados Negativos** — Los tests de muestras con lecturas de absorbancia relativa inferiores al valor de corte ( $A_r = 0.04$  unidades) son negativas y se reportan como No Detectados.

**Resultados Positivos** — Los tests de muestras con lecturas de absorbancia relativas iguales o superiores al valor de corte ( $A_r = 0.04$  unidades) son positivas y se reportan como Detectados.

(5) Para los resultados positivos, obtener el  $\log_{10}$  de la absorbancia relativa.

(6) Estimar la concentración de *Legionella sp* en el volumen examinado introduciendo el valor del  $\log_{10}$  de la absorbancia relativa ( $A_r$ ) en la siguiente formula:

$$y = 2.3061 x + 4.9815, \text{ donde } x = \log_{10}(A_r) \text{ e } y = \log_{10} (\text{UFC}_{\text{eq}}/\text{volumen examinado})$$

(7) El resultado se obtiene aplicando la transformación inversa del logaritmo:

$$\text{Contaminación (UFC}_{\text{eq}}/\text{volumen examinado)} = 10^y$$

Nota: Si lo desea, puede solicitar una hoja Excel programada para el cálculo automático de las concentraciones

**Al final del ensayo vacíe las cubetas y deséchelas. No reutilice las cubetas ni los restos de reactivos.**

## VIII. CONFIRMACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS

En la certificación de AOAC-RI, un resultado positivo por Legipid® *Legionella* Fast Detection se consideró un positivo presuntivo y se confirmó con métodos de cultivo estandarizados (por ejemplo ISO 11731:1998), sobre un volumen de 0.1-0.5 ml de la muestra preparada. En el caso de resultados que no se correspondan, entre Legipid® *Legionella* Fast Detection y el método de confirmación, el usuario debería seguir los pasos necesarios para asegurar la validez de sus resultados. La desviación positiva puede asociarse con una pobre recuperación de la bacteria diana por cultivo (células viables pero no cultivables-VBNC-), microbiota que inhibe el crecimiento de *Legionella*, etc.), o cumplimiento insuficiente de los lavados protocolizados en la etapa de marcaje.

## IX. CARACTERÍSTICAS Y VALIDACIÓN DEL TEST

El kit Legipid® *Legionella* Fast Detection kit es un test rápido y sencillo para la detección de *Legionella sp* en muestras de agua. Su nivel de detección relativa es de 93 UFC<sub>eq</sub>/volumen examinado (LOD50). Con lectura óptica su límite de detección es de 40 UFC<sub>eq</sub>/volumen examinado y su límite de cuantificación de 60 UFC<sub>eq</sub>/volumen examinado.



El kit Legipid® *Legionella* Fast Detection está validado por el AOAC-Research Institute en el programa Performance Tested Method Program para agua potable, natural e industrial. Certificado nº 111101

## X. REFERENCIAS

1. International Organization for Standardization. 1998 ISO 11731:1998. Water quality - Detection and enumeration of *Legionella*.
2. International Organization for Standardization. 2004. ISO 11731-2:2004. Water quality - Detection and enumeration of *Legionella* -- Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
3. Ragull S, Garcia-Nuñez M, Pedro-Botet ML, Sopena N, Esteve M, Montenegro R, et al *Legionella pneumophila* in Cooling Towers: Fluctuations in Counts, Determination of Genetic Variability by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), and Persistence of PFGE Patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007; 73: 5382–5384
4. Alleron L, Frère J, Merlet N, Legube B. Monochloramine treatment induces a viable but non culturable state into biofilm and planktonic *Legionella pneumophila* populations. In N. P. Cianciotto, Y. Abu Kwaik, P.H. Edelstein, B.S. Fields, D.F. Geary, T.G. Harrison, C. Joseph, R.M. Ratcliff, J.E: Stout, and M.S. Swanson (eds.), *Legionella: state of the Art 30 years after its recognition*, ed. ASM Press, Washington, DC. 2006. p. 533-537
5. Steinert M, Emody L, Amann R, Hacker J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997; 63: 2047-2053.
6. Garcia, M. T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R. D. & Abu Kwaik, Y. (2007). *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ. Microbiol.* 9, 1267-1277.
7. Pilar Delgado-Viscogliosi et al. 2005. Rapid Method for Enumeration of viable *Legionella pneumophila* and Other *Legionella spp* in Water. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No 7, p.4086-4096.

**Advertencia al usuario:** Utilice este producto sólo para análisis medioambiental

<p><b>Núm. Lote:</b></p> <p><b>Caducidad desde fecha fabricación:</b></p>	<p>Para <b>asistencia técnica</b> por favor contacte: Biótica, Bioquímica Analítica, S.L. Parque Científico y Tecnológico, Universidad Jaume I Edif. Espaitec 2, planta baja, lab 2 12071 – Castellón, España <a href="http://www.biotica.es">www.biotica.es</a> <a href="mailto:info@biotica.es">info@biotica.es</a> Tel.: +34 964108131 Fax: +34 964737790</p>	
---	--	--

### IMPORTANTE:

- Esta guía no sustituye al protocolo, leer el protocolo con detenimiento antes de iniciar el test.
- No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad.
- Utilizar un control negativo (reactivo L0) para cada tanda de ensayos.
- Dejar atemperar alícuotas de los reactivos a utilizar (18-26 °C) al menos durante 30 minutos antes de su uso.
- Las cubetas son desechables. No reutilizar.
- Utilizar el tapete posicionador correspondiente al concentrador de partículas magnéticas utilizado.
- Los reactivos son suministrados en exceso. No utilizar sobrantes de ningún reactivo.

#### Preparación Muestra

- Filtrar 1 L de muestra a través de un filtro de policarbonato de 0,4 micras.
- Sumergir el filtro (preferiblemente cortado) en 10 ml de L0 para su posterior elución.
- Eluir durante 2 min por agitación (vortex o manual) o 5 min en ultrasonidos.
- Transferir 9 ml del eluido inmediatamente después de la elución a la cubeta de análisis.

#### Captura

- Agitar el reactivo **L1** para homogeneizar las partículas magnéticas.
  - Añadir **9 ml** de la muestra en una cubeta y **9 ml** de **L0** (control) en otra.
  - Añadir **1 ml** del reactivo **L1** en cada cubeta.
  - Insertar los tapones y colocar las cubetas en posición horizontal en el agitador.
  - Agitar a **80 rpm** durante **15 min**.
  - Quitar tapones, desecharlos. **Retener** durante **5 min**.
  - Desechar el sobrenadante por el lado contrario del imán (**con las partículas retenidas**).
- 
- Añadir **4.5 ml** de **L2** tanto en la muestra como en el control.
  - Agitar a **350 rpm** durante **10 segundos**.
  - Retener** durante **3 min**.
  - Desechar el sobrenadante por el lado contrario del imán (**con las partículas retenidas**).

#### Marcado

- Añadir **1 ml** de **L3** tanto en la muestra como en el control.
- Agitar a **250 rpm** durante **10 segundos** y continuar a **80 rpm** durante **10 min**.
- Retener durante **3 min**.
- Desechar el sobrenadante por el lado contrario del imán (**con las partículas retenidas**).

#### Lavados

- Añadir **4.5 ml** de **L2** tanto en la muestra como en el control.
  - Agitar a **350 rpm** durante **10 segundos**.
  - Retener durante **3 min**.
  - Desechar el sobrenadante por el lado contrario del imán (**con las partículas retenidas**).
- Ejecutar cuidadosamente las etapas de lavado**
- REALIZAR ESTE PASO UN TOTAL DE 3 VECES**

#### Detección

- Añadir **1 ml** de **L4** en la muestra y el control.
- Agitar a **250 rpm** durante **10 segundos** y continuar a **80 rpm** hasta los **2 min**.
- Parar la reacción con **100 microlitros de L5**.
- Agitar y retener** durante **5 min**.
- Pipetear **1 ml** de cada ensayo **para medición** por espectrofotometría o carta de color.