

Legipid[®] Legionella Fast Detection

Referencia:
311-10-01

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

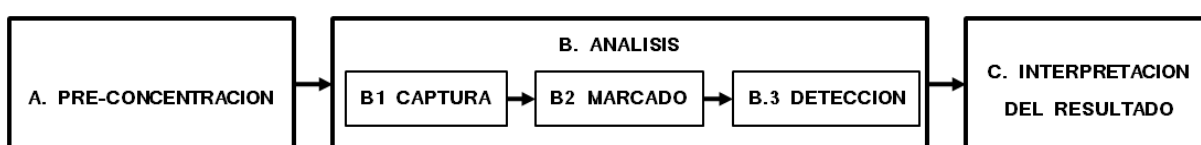
X. REFERENCIAS

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

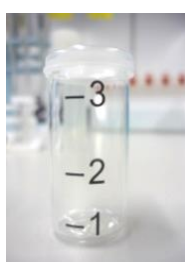
La referencia **311-10-01 (10 test)** contiene los elementos indicados en la siguiente tabla:

Reactivo/componente	ID	Cantidad suministrada
Eluyente	L0	1 frasco (110 mL)
Reactivo de captura (partículas inmunomagnéticas)	L1	10 monodosis (10 x 1 mL)
Tampón de lavado	L2	1 frasco (200 mL)
Anticuerpo anti- <i>Legionella</i> conjugado con enzima	L3	10 monodosis (10 x 1 mL)
Co-substratos enzimáticos	L4	5 tetra dosis (5 x 5 ml)
Reactivo de parada	L5	1 frasco (2 mL)
Cubeta	CB	10 unidades
Pipetas desechables	DP	15 unidades

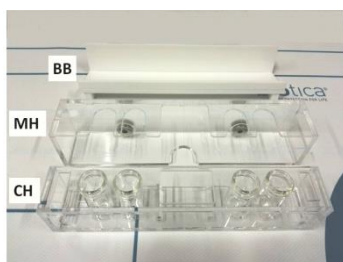
El concentrador **MP4-Hunter (311-MP4-SP)** contiene los elementos listados en la siguiente tabla:

MP4-Hunter (ref. 311-MP4-SP), 1 unidad		
Componente	ID	Cantidad
Soporte Insertable para 4 cubetas	311-MP4-CH	1
Soporte magnético para 4 cubetas	311-MP4-MH	1
Soporte de sujeción	311-MP4-BB	1

El tapete posicionador (**311-MP4-TC**) puede utilizarse para evitar la excesiva proximidad entre imanes. Si no dispone de él, mantenga al menos una distancia de 12 cm entre concentradores.



311-10 CB



311-MP4-SP



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

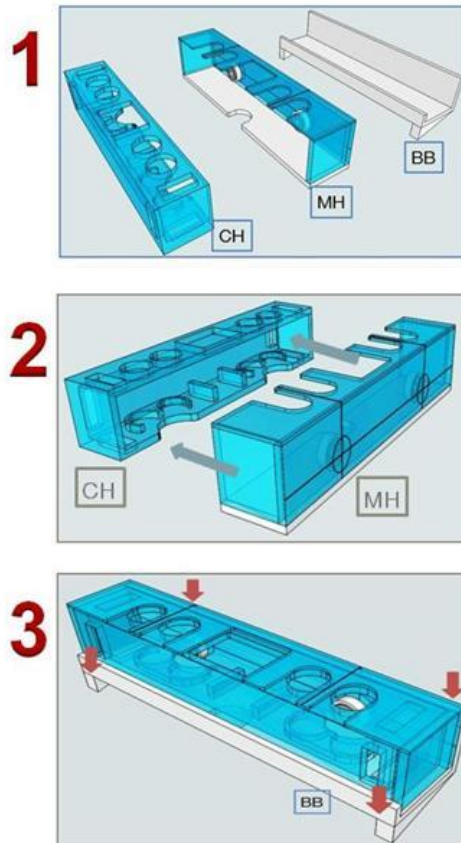
ENSAMBLADO MP4

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).

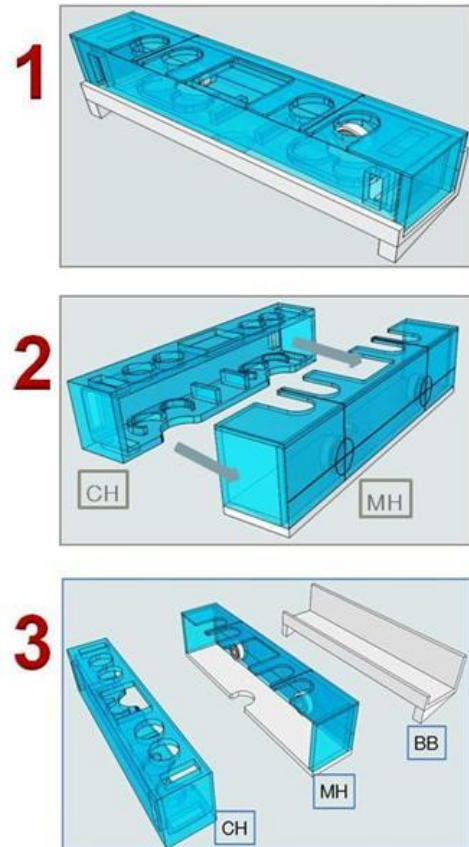
DESMONTAJE MP4

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) para packs de 40 y 100 tests).



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, 2.7µm de diámetro de poro, para uso como pre-filtro (*).
- ◆ Filtro de membrana, diámetro de poro 0.4µm en el caso de filtros de policarbonato (**).
- ◆ Contenedor para residuo.
- ◆ Aparato de filtración (***), para pre-concentrar muestras de agua por filtración de membrana.
- ◆ Opcional: Primelab (ref. 911-10-PL), y cubetas de lectura (ref.511-10-04, caja de 100 unidades)
- ◆ 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 PARA MEJORES RESULTADOS

- ◆ 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 10⁶ 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.**
- ◆ Saque del frigorífico las monodosis y las tetradosis necesarias para realizar el número de ensayos programado.
- ◆ **Dejar atemperar la cantidad requerida de L3 protegida de la luz.**
- ◆ Utilizar el tapete posicionador (Ref. 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

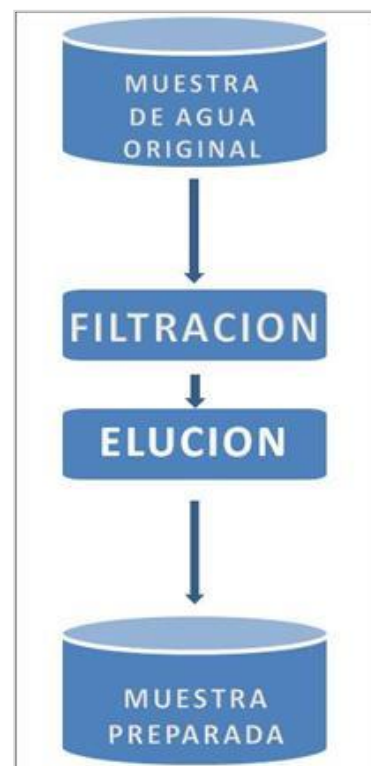
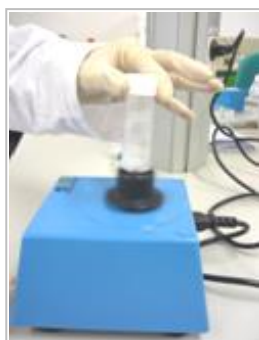
1. Recoja el volumen de muestra del agua original que desea concentrar (por ejemplo por filtración).
2. Añada 10ml del eluyente en un frasco. Use como eluyente L0.
3. Filtre el volumen recogido utilizando un filtro de membrana (*). Para muestras muy sucias, puede usar un pre filtro de fibra de vidrio de 2.7 µm de tamaño de poro situado sobre el filtro de membrana.
 (*) se utilizó 0.4 µm 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.

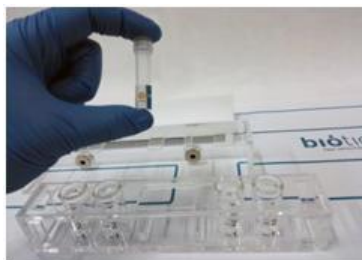
B. Análisis con el kit Legipid® Legionella Fast Detection

Antes de comenzar el test:

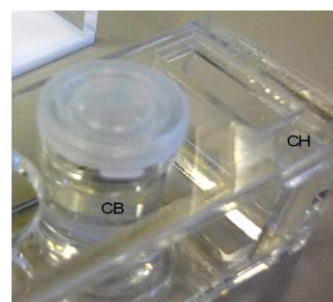
- ó **Sacar las monodosis y tetradosis necesarias y dejarlas 30 minutos a temperatura ambiente antes de su utilización.**
- ó Inserte las cubetas (CB) en su soporte (CH), tantas como muestras vaya a realizar y la del control.

B.1) ETAPA DE CAPTURA

1. Agite el L1 por inversiones repetidas, hasta obtener una suspensión completamente homogénea, y añada todo el contenido del vial (1ml) a cada cubeta.



2. Añada L0 en la cubeta de control (C) hasta la línea 3 (9 ml). Añada la muestra (previamente filtrada y eluída) en la cubeta de test (T) hasta la línea 3 (9 ml) (con cuidado de no dejar caer trozos de filtro, si lo ha cortado).



3. COLOQUE LOS TAPONES en las cubetas, agite **en vaivén suave y sobre el tapete, los soportes** con las cubetas en posición **horizontal, 3 veces cada 3 minutos, durante 15 minutos.**

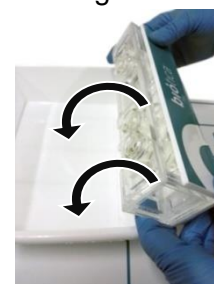


4. RETIRE y DESECHE LOS TAPONES (en posición vertical). Ensamble el MP4 (ver pág. 4) y colóquelo en su posición del tapete (TC). Espere **5 minutos** para retener las partículas magnéticas.

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

6. Desensamble el MP4. Añada el reactivo **L2** hasta la **línea 2** en cada cubeta (**4.5ml**) insertada en el soporte (CH).

7. Agite en vaivén enérgico SIN TAPONES hasta resuspender las partículas durante **10 segundos.**



8. Ensamble el MP4 y colóquelo en su posición del tapete (TC). 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 el MP4 y coloque el soporte de cubetas (CH) en su posición del tapete (TC). Añada todo el contenido de un vial de **L3** (1 ml) a cada cubeta.

2. Agite **en vaivén enérgico** durante **10 segundos**, hasta resuspender las partículas y luego agite **suavemente SIN TAPONES** cada **2 minutos** durante **10 minutos**.

3. Ensamble el MP4 y colóquelo 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 el MP4. Añada el reactivo **L2** hasta la **línea 2** (4.5 ml) en cada cubeta insertada en el soporte (CH).

6. Agite sobre el tapete **en vaivén enérgico SIN TAPONES** hasta resuspender las partículas (**10 segundos**).

7. Ensamble el MP4 y colóquelo en su posición del tapete (TC). Espere **3 minutos** para retener las partículas magnéticas.

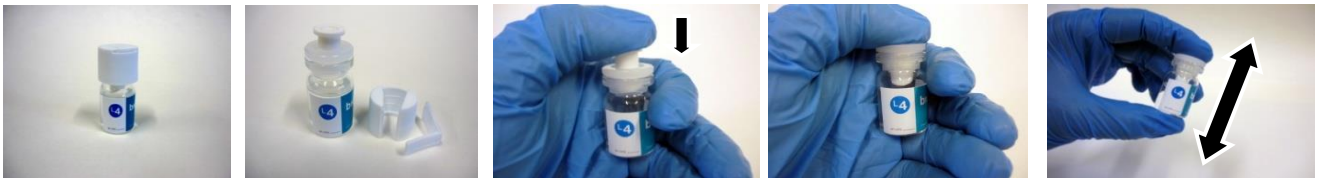
8. **Repita los pasos 4, 5, 6 y 7 (de esta sección B.2 ETAPA DE MARCADO) dos veces más**



B.3) ETAPA DE DETECCIÓN

1. Deseche el sobrenadante vertiendo **por el lado contrario a los imanes**, rotando el conjunto. Desensamble los MP4 y coloque el soporte de cubetas (CH) sobre el tapete.

2. Prepare el reactivo L4 (un vial para cada 4 ensayos): desprecinte el tapón protector y retírelo. Pulse el pistón hasta quedar completamente insertado en el obturador. **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.

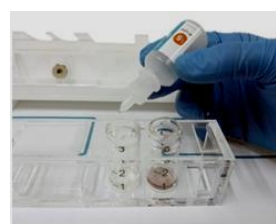
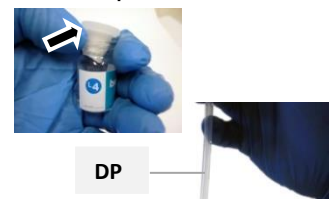
4. **Inmediatamente añada con pipeta desechable (DP) 1 ml de L4 a cada cubeta**. Agite **enérgicamente SIN TAPONES** durante **10 segundos** para resuspender las partículas, y luego **suavemente** siga hasta los **2 minutos**.

(Nota: empiece a contar el tiempo desde la primera adición de L4)

5. Pare de agitar. Añada **3 gotas de L5** (100 µl), a todas y cada una de las cubetas y agite durante **5 segundos en vaivén suave**.

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

6. Ensamble de nuevo el MP4. Espere **5 minutos** para retener las partículas magnéticas.



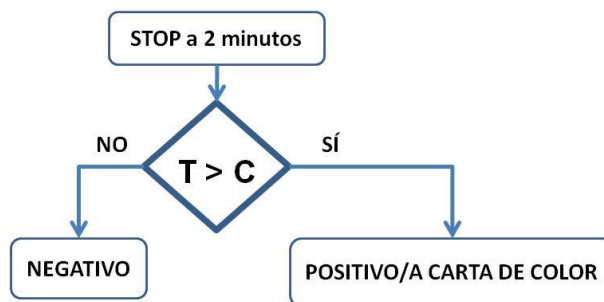
Control (C)

Test (T)

C. RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DEL TEST

C.1. Interpretación Visual

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

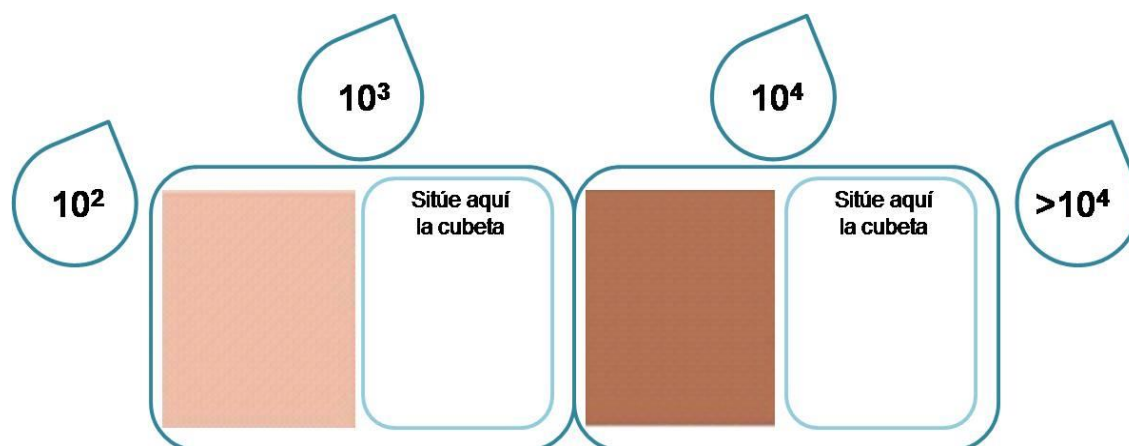


T: COLOR DEL TEST C: COLOR DEL CONTROL

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_{eq}/volumen examinado). Por debajo del segundo color de la carta: hasta tres órdenes de magnitud (10^3 UFC_{eq}/volumen examinado). A partir del segundo color de la carta: igual o mayor que cuatro órdenes de magnitud (10^4 UFC_{eq}/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_{eq}/volumen examinado (LOD50). Con lectura óptica su límite de detección es de 40 UFC_{eq}/volumen examinado y su límite de cuantificación de 60 UFC_{eq}/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>Núm. Lote:</p> <p>Caducidad desde fecha fabricación:</p>	<p>Para asistencia técnica 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 www.biotica.es info@biotica.es 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 polycarbonato 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 que ya contiene 1 mL de L1 (ver captura).

Captura

- Agitar suavemente el reactivo **L1** para homogeneizar bien las partículas magnéticas.
 - Añadir **1 ml** del reactivo **L1** en cada cubeta (**hasta la línea 1**).
 - Añadir **9 ml** de la muestra en una cubeta y **9 ml** de **L0** (control) en otra (**hasta la línea 3**).
 - Insertar los tapones.
 - Agitar suave, **3 veces cada 3 min** durante **15 minutos** (cubetas en posición horizontal).
 - 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 (**hasta la línea 2**).
 - Agitar enérgicamente hasta resuspender las partículas 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 (**hasta la línea 1**).
- Agitar enérgico durante **10 segundos** y agitar suave cada 2 min 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 (**hasta la línea 2**).
 - Agitar enérgicamente hasta resuspender las partículas durante **10 segundos**.
 - Retener durante **3 min**.
 - Desechar el sobrenadante por el lado contrario del imán **con las partículas retenidas**.
- Ejecutar cuidadosamente el paso de lavado**
- REALIZAR ESTE PASO UN TOTAL DE 3 VECES**

Detección

- Añadir **con pipeta pasteur 1ml** de **L4** en la muestra y en el control (**hasta la línea 1**).
- Agitar enérgico durante **10 segundos** y agitar suave durante **2 min**.
- Parar la reacción con **3 gotas de L5**.
- Agitar, y luego retener** durante **5 min**.
- Pipetear **1 ml** de cada ensayo **para medición** por espectrofotometría o carta de color