

VIROTECH Enterovirus IgG ELISA
(Enterovirus IgG ELISA)

Referencia: EC116G00

VIROTECH Enterovirus IgM ELISA
(Enterovirus IgM ELISA)

Referencia: EC116M00

VIROTECH Enterovirus IgA ELISA
(Enterovirus IgA ELISA)

Referencia: EC116A00

Código de color: IgG: marrón/ oscuro marrón
IgM, tira de prueba: marrón
IgM, tira de referencia: marrón/transparente
IgA: incoloro

EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Freigabedatum: 31.1.2019

REV 15 / VIROTECH Enterovirus IgG & IgM & IgA ELISA ES

Índice

1. Finalidad de la prueba.....	3
2. Principio de la prueba.....	3
3. Contenido	3
3.1 Kit de ensayo IgG	3
3.2 Kit de ensayo IgA	3
3.3 Kit de ensayo IgM.....	3
4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar	4
5. Medidas de precaución y advertencias.....	4
6. Material adicional necesario (no suministrado).....	4
7. Realización de la prueba.....	5
7.1 Material de muestra.....	5
7.2 Preparación de los reactivos.....	5
7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH.....	5
7.4 Empleo de procesadores ELISA.....	6
8. Valoración del ensayo.....	6
8.1 Control del funcionamiento del ensayo (IgG e IgA)	6
8.2 Control del funcionamiento del ensayo (IgM).....	6
8.3 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE) (IgG e IgA)	7
8.4 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE) (IgM).....	7
8.5 Valoración de los resultados (IgG, IgM e IgA).....	7
8.6 Limitaciones del ensayo	8
9. Literatura	8
10. Esquema de la realización de la prueba.....	9

1. Finalidad de la prueba

Esta prueba ELISA sirve para la determinación de anticuerpos específicos de grupo IgG, IgA e IgM contra enterovirus en suero humano.

2. Principio de la prueba

El anticuerpo (IgG, IgA) buscado en el suero humano forma un complejo inmune con el antígeno fijado en la placa de microtitulación. Las inmunoglobulinas no ligadas son eliminadas mediante procesos de lavado. El conjugado enzimático se liga al citado complejo. Las inmunoglobulinas no ligadas son de nuevo eliminadas mediante procesos de lavado. Tras la adición de la solución de sustrato (TMB), la actividad enzimática (peroxidasa) da lugar a un pigmento azul, que adopta un color amarillo después de añadir la solución de paro.

El anticuerpo (IgM) buscado en el suero humano reacciona según lo descrito para IgA e IgG. Además de la placa de microtitulación recubierta de antígeno (tira de prueba), también se utiliza una segunda placa de microtitulación (tira de referencia). La diferencia en la intensidad del color entre la tira de prueba y la tira de referencia constituye una indicación de la cantidad de antígenos ligados.

3. Contenido

3.1 Kit de ensayo IgG

1. **1 placa de microtitulación**, que consta de 96 cavidades individuales separables recubiertas con antígeno liofilizado
2. **Tampón de dilución PBS (azul, listo para utilizar), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Tampón de lavado PBS (concentración 20x), 50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
4. **Control negativo para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
5. **Control de nivel de corte para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
6. **Control positivo para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
7. **Conjugado IgG (anti-humano), 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con estabilizadores de proteínas y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
8. **Solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB 3,3',5,5'), 11ml**, lista para utilizar
9. **Solución de paro de citrato, 6ml**, contiene una mezcla de ácidos

3.2 Kit de ensayo IgA

1. **1 placa de microtitulación**, que consta de 96 cavidades individuales separables recubiertas con antígeno liofilizado
2. **Tampón de dilución PBS (azul, listo para utilizar), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Tampón de lavado PBS (concentración 20x), 50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
4. **Control negativo para IgA, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
5. **Control de nivel de corte para IgA, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
6. **Control positivo para IgA, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
7. **Conjugado IgA (anti-humano), 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con FCS y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
8. **Solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB 3,3',5,5'), 11ml**, lista para utilizar
9. **Solución de paro de citrato, 6ml**, contiene una mezcla de ácidos

3.3 Kit de ensayo IgM

Caja 1

1. **1 placa de microtitulación (tira de prueba)**, que consta de 96 cavidades individuales separables recubiertas con antígeno liofilizado
2. **Tampón de dilución PBS (azul, listo para utilizar), 3x50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB 3,3',5,5'), 2x11ml**, lista para utilizar

Caja 2

1. **1 placa de microtitulación (tira de referencia)**, que consta de 96 cavidades individuales separables recubiertas
2. **Tampón de lavado PBS (concentración 20x), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Control negativo para IgM, 4000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
4. **Control de nivel de corte para IgM, 4000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
5. **Control positivo para IgM, 4000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
6. **Conjugado IgM (anti-humano), 2x11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con FCS y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
7. **Solución de paro de citrato, 2x6ml**, contiene una mezcla de ácidos

4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar

Conserve el kit de ensayo a 2-8°C. El plazo de caducidad de cada componente figura en la correspondiente etiqueta; el plazo de caducidad del kit puede consultarse en el certificado de control de calidad.

1. Una vez separados los pocillos individuales necesarios conserve los restantes pocillos / tiras en la bolsa cerrada con desecante a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos deben volverse a guardar a 2-8°C inmediatamente después de su uso.
2. El conjugado listo para utilizar y la solución de sustrato TMB son fotosensibles y deben conservarse en la oscuridad. Si la solución de sustrato se tiñe por efecto de la luz, debe desecharse.
3. Extraiga únicamente la cantidad de conjugado listo para utilizar o de TMB necesaria para la prueba. El exceso de conjugado o TMB extraído no debe devolverse, sino que debe ser desechado.

Material	Estado	Almacenamiento	Durabilidad
Muestras de análisis	diluidas	de +2 hasta +8°C	máx. 6h
	sin diluir	de +2 hasta +8°C	1 semana
Controles	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Placa de microtitulación	tras la apertura	de +2 hasta +8° (almacenamiento en la bolsa suministrada con bolsita de secante)	3 meses
Absorbente del factor reumatoide	sin diluir, tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	diluido	de +2 hasta +8°C	1 semana
Conjugado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Tetrametilbencidina (TMB)	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Solución de parada	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Solución de lavado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	dilución final (lista para el uso)	de +2 hasta +25°C	4 semanas

5. Medidas de precaución y advertencias

1. Como sueros de control sólo deben utilizarse sueros que hayan dado resultado negativo en las pruebas de anticuerpos VIH1, anticuerpos VIH2, anticuerpos VHC y antígeno de superficie de la hepatitis B. En cualquier caso, todas las muestras, muestras diluidas, controles, conjugados y tiras de microtitulación deben considerarse como material potencialmente infeccioso y manipularse con las correspondientes precauciones. Deberán seguirse las correspondientes directrices para trabajos de laboratorio.
2. Los componentes que contienen conservante, así como la solución de parada de citrato y la TMB, son irritantes para la piel, los ojos y las mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la parte afectada con abundante agua y acuda al médico si fuera necesario.
3. Los materiales utilizados deberán eliminarse según la normativa de eliminación de residuos de cada país.

6. Material adicional necesario (no suministrado)

1. Agua destilada/desionizada
2. Pipeta multicanal 50µl, 100µl

3. Micropipetas: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Tubos de ensayo
5. Servilletas de celulosa
6. Cubierta para placas ELISA
7. Recipientes para residuos infecciosos
8. Aparato de lavado manual para ELISA o aparato de lavado automático para placas de microtitulación
9. Espectrofotómetro para placas de microtitulación con filtro de 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm)
10. Estufa de incubación

7. Realización de la prueba

El cumplimiento exacto de las instrucciones de VIROTECH Diagnostics es el requisito previo para obtener resultados correctos.

7.1 Material de muestra

Como material de análisis es posible utilizar suero o plasma (sin importar el tipo de anticoagulantes), aunque en el prospecto sólo se mencione el suero.

Las diluciones de pacientes siempre deben prepararse frescas.

Para un almacenamiento más prolongado, los sueros deben congelarse. Evítese una descongelación repetida.

1. Sólo deben utilizarse sueros recientes no inactivados.
2. No deben emplearse muestras hiperlipémicas, hemolíticas o con contaminación microbiana ni sueros que presenten turbidez (riesgo de falsos positivos o negativos).

7.2 Preparación de los reactivos

El sistema de diagnóstico de VIROTECH Diagnostics ofrece una gran flexibilidad al permitir el uso de los mismos tampones de dilución y lavado, TMB, solución de paro de citrato y conjugado para todos los parámetros y lotes. Los controles listos para utilizar (control positivo, control de nivel de corte, control negativo) son específicos para cada parámetro y deben emplearse exclusivamente con el lote de placas indicado en el certificado de control de calidad.

1. Seleccione una temperatura de 37°C en la estufa y cerciórese de que se ha alcanzado dicha temperatura antes de comenzar la incubación.
2. Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el envase con las tiras de prueba.
3. Agite bien todos los componentes líquidos antes de su uso.
4. Completar el concentrado de solución de lavado a 1 litro con agua destilada/desionizada (en caso de una eventual formación de cristales en el concentrado, éste debe llevarse a temperatura ambiente antes de la dilución, agitándolo bien antes del uso).
5. Los niveles elevados de IgG o los factores reumáticos pueden interferir en la determinación de anticuerpos IgM y provocar falsos positivos o falsos negativos. **Tratar previamente los sueros con RF-SorboTech** (agente de adsorción VIROTECH). En el caso de los controles IgM no es necesaria la adsorción previa.

7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH

En el caso de **IgM**, todas las muestras que deben analizarse se ensayan tanto en la **tira de prueba** (tira con antígeno de enterovirus) como en la **tira de referencia** (tira con antígeno de control). Por ello, antes de la prueba se introducen de forma adyacente en un soporte las tiras de prueba y de referencia necesarias según el número de muestras. **Sólo deben combinarse entre sí tiras de prueba y de referencia con los números de lote indicados en el certificado de control de calidad.**

Las pruebas de IgA e IgG se realizan en una única placa de microtitulación.

1. Para cada prueba, pipetee 100µl del tampón de dilución listo para utilizar (valor cero), del control negativo, del control cut-off y del control positivo para IgG, IgM y IgA, así como de los sueros de paciente diluidos. Recomendamos ensayar duplicados en cada caso (valor cero, controles y sueros de paciente); en el caso del control cut-off, la preparación de duplicados imprescindible. Dilución de trabajo de los sueros de paciente: 1+100; p.ej. 10µl de suero + 1ml de tampón de dilución.
2. Tras el pipeteado tiene lugar la incubación a 37 °C (con cubierta) durante 30 min.

3. El periodo de incubación finaliza con 4 lavados utilizando cada vez 350-400µl de solución de lavado por cavidad. No deje solución de lavado en los pocillos: retire los últimos restos de líquido sacudiendo sobre una superficie de celulosa.
4. Pipetee en todas las cavidades 100µl del conjugado listo para utilizar.
5. Incubación de los conjugados: 30 min. a 37°C (con cubierta).
6. Finalización de la incubación de los conjugados con 4 lavados (véase el punto 3).
7. Pipetee en cada pocillo 100µl de la solución de sustrato TMB lista para utilizar.
8. Incubación de la solución de sustrato: 30 minutos a 37°C (con cubierta, en la oscuridad).
9. Paro de la reacción de sustrato: pipetee en cada pocillo 50µl de la solución de parada de citrato. Agite cuidadosamente la placa hasta que los líquidos se hayan mezclado por completo y pueda verse un color amarillo uniforme.
10. Mida la absorbancia a 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm). Ajuste el fotómetro de modo que se reste el valor obtenido para el valor cero de todos los demás valores de absorbancia. La medición fotométrica debe realizarse en la hora siguiente a la adición de la solución de paro.

Véase esquema de la realización de la prueba en la última página

7.4 Empleo de procesadores ELISA

Todas las pruebas ELISA de VIROTECH Diagnostics pueden realizarse con ayuda de procesadores ELISA. El usuario está obligado a validar periódicamente el aparato.

VIROTECH Diagnostics recomienda el siguiente procedimiento:

1. Al instalar el aparato, o en caso de reparaciones importantes de su procesador ELISA, VIROTECH Diagnostics recomienda validarlo según las instrucciones del fabricante.
2. Se recomienda comprobar seguidamente el procesador ELISA con el kit de validación (EC250.00). Esta comprobación periódica con el kit de validación debe realizarse al menos una vez al trimestre.
3. En cada ciclo de prueba deben cumplirse los criterios de autorización del certificado de control de calidad del producto. Este modo de procedimiento garantiza la función impecable de su procesador ELISA, sirviendo además para el aseguramiento de calidad del laboratorio.

8. Valoración del ensayo

Los controles listos para utilizar sirven para una determinación semicuantitativa de los anticuerpos específicos IgG e IgM, cuya concentración se indica en unidades VIROTECH (VE). Las fluctuaciones debidas a la realización de la prueba se compensan con el método de cálculo, con lo que se alcanza una elevada reproducibilidad. Para el cálculo del valor VE se emplean los valores medios de las densidades ópticas.

8.1 Control del funcionamiento del ensayo (IgG e IgA)

a) Valores de densidad óptica

El valor de densidad óptica correspondiente al valor cero debe ser inferior a 0,15.

Los valores de densidad óptica (DO) de los controles negativos deben estar por debajo de los valores de DO indicados en el certificado de control de calidad, mientras que los valores de DO de los controles positivos y del cut -off deben estar por encima de los valores de DO indicados en el certificado.

b) Unidades VIROTECH (VE)

Las unidades VIROTECH (VE) de los controles cut-off se definen como 10 VE. Los VE calculados para los controles positivos deben estar dentro de los intervalos indicados en el certificado de control de calidad.

Si no se cumplen estas exigencias (valores de DO, VE), debe repetirse la prueba.

8.2 Control del funcionamiento del ensayo (IgM)

1. De todos los valores de extinción de los controles positivos, de corte y negativos, así como de los sueros de paciente en la tira de prueba, se restan los valores cero (= **Í valores de pruebaĀ**).
2. De todos los valores de extinción de los controles positivos, de corte y negativos, así como de los sueros de paciente en la tira de referencia, se restan los valores cero (= **Í valores de referenciaĀ**).
3. Para todos los controles positivos, de corte y negativos, así como los sueros de paciente, se calculan las **Í diferencias entre los valores de prueba y los valores de referenciaĀ** restando los valores de referencia de los correspondientes valores de prueba.

a) Valores de densidad óptica

La diferencia entre el valor de prueba y el valor de referencia de los controles negativos deben estar por debajo de los valores de DO indicados en el certificado de control de calidad, mientras que la diferencia entre el valor de prueba y el valor de referencia de los controles positivos y de nivel de corte deben estar por encima de los valores de DO indicados en el certificado.

b) Unidades VIROTECH (VE)

Las unidades VIROTECH (VE) de los controles de nivel de corte se definen como 10 VE. Los VE calculados para los controles positivos deben estar dentro de los intervalos indicados en el certificado de control de calidad.

Si no se cumplen estas exigencias (valores de DO, VE), debe repetirse la prueba.

8.3 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE) (IgG e IgA)

La absorbancia correspondiente al valor cero (450/620 nm) debe restarse de todos los valores de absorbancia.

$$VE_{(\text{control positivo})} = \frac{DO_{(\text{control positivo})}}{DO_{(\text{control de nivel de corte})}} \times 10$$

$$VE_{(\text{suero del paciente})} = \frac{DO_{(\text{suero del paciente})}}{DO_{(\text{cut - off})}} \times 10$$

8.4 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE) (IgM)

La extinción correspondiente al valor cero (450/620 nm) debe restarse de todos los valores de extinción.

$$VE_{(\text{control positivo})} = \frac{\text{Diferencia (valor de prueba . valor de ref. del control positivo)}}{\text{Diferencia (valor de prueba . valor de ref. del control de nivel de corte)}} \times 10$$

$$VE_{(\text{suero del pte.})} = \frac{\text{Diferencia (valor de prueba . valor de ref. del suero del paciente)}}{\text{Diferencia (valor de prueba . valor de ref. del control de nivel de corte)}} \times 10$$

Ejemplo:

- Densidad óptica en la tira de prueba del control positivo: 0,853
- Densidad óptica en la tira de referencia del control positivo: 0,107
- Diferencia entre el valor de prueba y el valor de referencia del control positivo: 0,746
- Densidad óptica en la tira de prueba del control de corte: 0,341
- Densidad óptica en la tira de referencia del control de corte: 0,073
- Diferencia entre el valor de prueba y el valor de referencia del control de corte: 0,268

$$VE_{(\text{control positivo})} = \frac{0,746}{0,268} \times 10 = 27,8$$

8.5 Valoración de los resultados (IgG, IgM e IgA)

Resultado (VE)	Valoración
< 9,0	negativo
9,0 - 11,0	zona límite
> 11,0	positivo

1. Si las VE calculadas para la muestra están por encima de la zona límite, la muestra se considera positiva.
2. Si las VE se encuentran dentro de la zona límite, no existe una concentración de anticuerpos significativamente alta, por lo que se considera que las muestras presentan un carácter límite. Para la determinación segura de una infección es necesario determinar el nivel de anticuerpos de dos muestras de suero: Una muestra debe tomarse inmediatamente tras el comienzo de la infección, y otra 5-10 días después (suero de convalecencia). La concentración de anticuerpos de ambas muestras debe determinarse en paralelo, es decir, en una misma prueba. No es posible un diagnóstico correcto a partir de la valoración de una única muestra de suero.
3. Si los valores medidos se encuentran por debajo de la zona límite, la muestra no contiene anticuerpos detectables específicos para el antígeno en cuestión. La muestra se considera negativa.

8.6 Limitaciones del ensayo

La respuesta inmunitaria puede ser homotípica o heterotípica. Los anticuerpos homotípicos se dirigen contra los epítomos específicos del serotipo mientras que los anticuerpos heterotípicos reconocen epítomos que son idénticos o similares en los serotipos.

La prueba VIROTECH-ELISA detecta anticuerpos heterotípicos con reactividad cruzada contra enterovirus con ayuda de preparados de antígenos desnaturalizados por calor. A la hora de diagnosticar una infección por enterovirus debe tenerse en cuenta lo siguiente:

1. La manifestación de los epítomos con reactividad cruzada a enterovirus inactivados térmicamente puede presentar diferencias cuantitativas y cualitativas dependiendo de los serotipos y cepas clínicas utilizadas para el preparado de antígenos. Por consiguiente, también puede variar el espectro de anticuerpos heterotípicos reconocidos con los diferentes sistemas de prueba.
2. La proporción entre anticuerpos homotípicos y heterotípicos en el suero de los pacientes puede variar. Los estudios de King et al. (6) apuntan a que durante las primeras infecciones por enterovirus a lo largo de la infancia se forman preferentemente anticuerpos homotípicos, y que sólo a una edad más avanzada, cuando el número de infecciones enterovíricas ya pasadas aumenta, se hace mayor la proporción de anticuerpos heterotípicos. Por lo tanto, en la prueba ELISA Enterovirus de VIROTECH pueden aparecer resultados negativos en los casos en que la respuesta inmunitaria heterotípica sea poco marcada frente a la homotípica.
3. Como la prueba ELISA también detecta sueros positivos para la poliomielitis, no puede descartarse que los anticuerpos vacunales existentes den lugar a un resultado positivo.
4. Se han descrito reacciones cruzadas entre enterovirus y el virus de hepatitis A, el virus de Epstein-Barr, el citomegalovirus y los rinovirus (7).
5. La interpretación de resultados serológicos debe tener siempre en cuenta el cuadro clínico, los datos epidemiológicos y los otros resultados analíticos que puedan existir.

9. Literatura

Diagnostische Bibliothek: Coxsackie- und Echoviren; In vitro Diagnostica Nachrichten; 24 (1994) 1-8.

MIQ 13; Infektionen des Mundes und der oberen Atemwege; 35-37 (2000).

RKI, Übersicht zu Erkrankungen durch Enteroviren, Stand: Mai 2002.

Bomann J et al., Serum IgA, IgG und IgM Responses to different Enteroviruses as measured by a Coxsackie B5-based indirect ELISA; J. Med.Virol.; 38:32-35 (1992).

Swanink CMA et al., Coxsackie B1-Based Antibody-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA with Broad Specificity for Enteroviruses, J. Clin. Microbiol. 31:3240-3246 (1993)

King M.J., Bidvell D., Shaikh A, Voller A., Banatvala J.E. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type 1) diabetes mellitus, Lancet i: 1397-9 (1983)

Samuelson, A. et al., Aspects on the serodiagnosis of enterovirus infections by ELISA, Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.; 4:395-406 (1990).

Preparación de las muestras de paciente y la solución de lavado

Solución de lavado: Añadir agua destilada/desionizada al concentrado hasta alcanzar 1 litro	
Dilución del muestras IgG/IgA 1:101	Dilución del muestras IgM 1:101
Absorción del factor reumático con RF-SorboTech	
p.ej. 10 µl de suero/plasma + 1000 µl de tampón de dilución (El tampón de dilución para suero está listo para utilizar)	p.ej. 5 µl de suero/plasma +450 µl de tampón de dilución 1 gota de RF-SorboTech, incubar 15 min a temp. amb.

Realización de la prueba

Incubación de muestras	30 minutos a 37°C	100 µl de muestras de paciente valor cero (tampón de dilución) y controles
↓		400 µl de solución de lavado sacudir bien
4 lavados		
↓		
Incubación de los conjugados	30 minutos a 37°C	100 µl de conjugado IgG, IgM, IgA
↓		400 µl de solución de lavado sacudir bien
4 lavados		
↓		
Incubación del sustrato	30 minutos a 37°C	100 µl de sustrato
↓		50 µl de solución de parada agitar con cuidado
Parada		
↓		
Medición de la absorbancia		Fotómetro a 450/620nm (longitud de onda de referencia 620-690nm)