

Tylko do diagnostyki in vitro

Zalecane zastosowanie

Zestaw ImmunoComb® II HBsAg jest szybkim testem przeznaczonym do jakościowego wykrywania antygenu powierzchniowego wirusa żółtaczkowego typu B (HBsAg) w ludzkiej surowicy lub osoczu. Z jednego zestawu można wykonać 36 oznaczeń.

Wprowadzenie

Wirus żółtaczkowy typu B (HBV) należy do nowej rodziny DNA wirusów zwanych *Hepadnaviridae*. Cechuje go wyraźny hepatotropizm i unikalny sposób replikacji poprzez mechanizm odwróconej transkrypcji. Kompletny wirion (cząsteczka Dane'a) składa się z kolistej molekuly DNA chronionej przez błonę osłaniającą jądro / antygen korowy (HBcAg), i otoczonej otoczką lipoproteinową zawierającą antygen powierzchniowy (HBsAg). HBsAg jest również wykrywany we krwi jako niekompletna, niezakaźna sferyczna cząsteczka lub włókno. W fazie replikacyjnej wirusa wykrywa się również we krwi drugorzędny składnik otoczki jądra HBV - antygen (HBeAg).

Wirus żółtaczkowy typu B jest rozpowszechnionym wirusem o światowym zasięgu. Wirus przenosi się głównie drogą bezpośrednią poprzez kontakt seksualny lub zakażenie pozajelitowe, a także pośrednią poprzez zakażenie prenatalne matka – dziecko.

Kliniczne skutki zakażenia HBV sięgają od całkowicie bezobjawowych (70% przypadków) do ostrej żółtaczki wątrobowej. Większość pacjentów całkowicie wraca do zdrowia w ciągu 6 miesięcy po rozpoczęciu choroby. U mniej niż 1,5% zakażonych może rozwinąć się nadostre zapalenie wątroby, które często kończy się zejściem śmiertelnym.

U znacznej części (powyżej 10%) dorosłych pacjentów, HBV może rozwinąć się w chroniczną żółtaczkę i ostatecznie doprowadzić do marskości i raka wątroby. Liczba trwale zarażonych żółtaczką typu B (200 milionów na całym świecie) tworzy główny rezerwuar wirusa i przyczynia się do rozprzestrzeniania choroby.

W typowym przypadku ostrej infekcji HBV, antygen HBsAg, któremu często towarzyszy HBeAg, pojawia się we krwi pomiędzy 2 a 6 tygodniem przed początkowymi objawami lub biochemicznymi zmianami świadczącymi o żółtaczce i osiąga pik podczas ostrej fazy choroby. Trwała obecność HBsAg w surowicy dłużej niż 6 miesięcy odzwierciedla stan nosicielstwa przewlekłego HBV. Badanie antygenu HBsAg umożliwia identyfikację pacjentów zainfekowanych HBV oraz pomaga w diagnozie i prognozowaniu choroby.

Zasada działania Testu

Test ImmunoComb® II HBsAg jest testem immunologicznym fazy stałej (EIA), opartym na zasadzie „kanapki”. Podstawową częścią jest karta z 12 miejscami reakcyjnymi („zęby”).

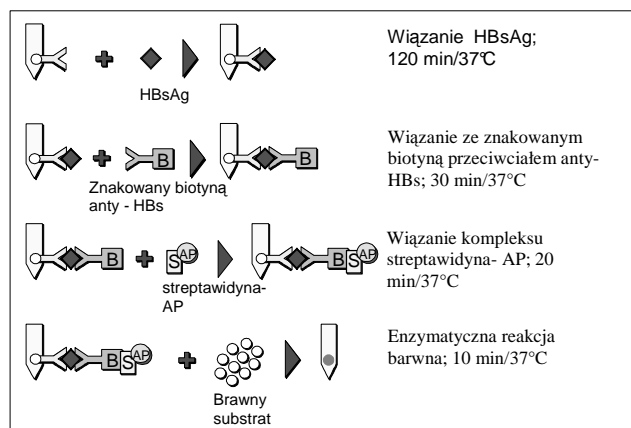
Zęby są uczulone w dwóch miejscach:

Górne pole — znakowana białym albumina surowicy bydlęcej (Kontrola Wewnętrzna)

Dolne pole) — przeciwciała monoklonalne anty - HBsAg

Płytkę rozwijającą posiada 6 rzędów (A-F) z 12 dołkami. Każdy rząd zawiera roztwór gotowego do użycia odczynnika do poszczególnych etapów oznaczenia. Test jest wykonywany etapowo, poprzez przenoszenie grzebienia do kolejnych rzędów i inkubację na każdym etapie. Do dołków rzędu A płytki rozwijającej zawierających roztwór dodaje się próbkę surowicy lub osocza, co daje początek badaniu. Następnie w tych dołkach zanurza się zęby grzebienia. HBsAg, obecny w próbce, będzie wiązany przez przeciwciała anty-HBs na dolnym polu zęba (Rysunek 1). Nie związane składniki są wmywane w rzędzie B. W rzędzie C, HBsAg związany na zębie, będzie reagował ze znakowanymi białym przeciwciałami anty - HBs.

W rzędzie D znakowany białym kompleks antygen/przeciwciało na dolnym polu i znakowana białym albumina surowicy bydlęcej na górnym polu (Kontrola Wewnętrzna), będą reagowały ze znakowaną fosfatazą alkaliczną (AP) streptawidyną. W dołkach rzędu E są wmywane niezwiązane składniki. W rzędzie F wbudowana fosfataza alkaliczna będzie reagować z barwnikiem i na powierzchni zębów w wyniku reakcji na polach reakcyjnych pojawia się szaro – niebieskie zabarwienie.



Rysunek 1. Zasada działania testu

Zestaw zawiera kontrolę dodatnią (HBsAg) i kontrolę ujemną, które powinny być wykonane przy każdej serii oznaczeń. Wynikiem testu z użyciem kontroli dodatniej powinny być dwie widoczne szaro – niebieskie plamki na zębie grzebienia natomiast z użyciem kontroli ujemnej powinna się pojawić jedynie górna plamka kontrolna przy braku zabarwienia dolnego pola lub z nieznacznym jego zabarwieniem. Górna plamka powinna również pojawiać się na wszystkich pozostałych zębach aby potwierdzić prawidłowość działania testu i poprawność jego wykonania.

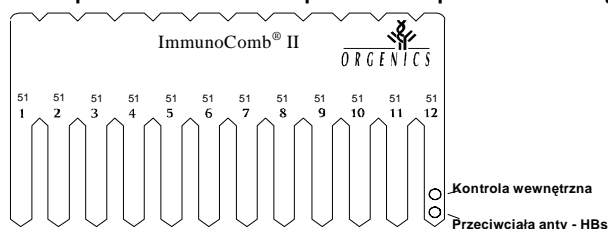
Skład zestawu

Karty (Grzebienie)

Zestaw zawiera 3 plastikowe karty posiadające 12 zębów (po jednym na każdy test - rysunek 2). Każdy ząb posiada dwa pola reakcyjne:

Górne pole — znakowana białym albumina surowicy bydlęcej (Kontrola Wewnętrzna)

Dolne pole — monoklonalne przeciwciała przeciwko HBsAg.



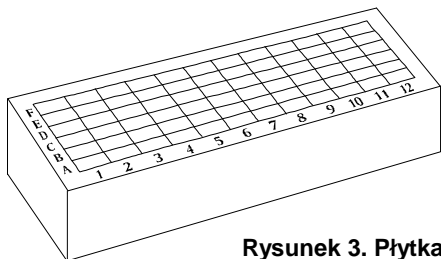
Rysunek 2. Karta

Grzebienie pakowane są w aluminiowe torebki z pochłaniaczem wilgoci.

Płytki rozwijająca

Zestaw zawiera 3 płytki rozwijające pokryte folią. Każda zawiera (Rysunek3) wszystkie odczynniki niezbędne do wykonania testu. Płytki rozwijająca składa się z 6 rzędów (A–F) po 12 dołków każdy. Poszczególne rzędy zawierają następujące odczynniki:

- Rząd A Rozcieńczalnik próbek
- Rząd B Roztwór płuczący
- Rząd C Znakowane białym kozie przeciwciała przeciwko HBs
- Rząd D Związek streptawidyna – fosfataza alkaliczna
- Rząd E Roztwór płuczący
- Rząd F Roztwór chromogenego substratu zawierający fosforan 5-bromo- 4-chloro- 3-indolowy (BCIP) i błękit nitrotetrazolowy (NBT)



Rysunek 3. Płytki rozwijająca

Kontrola dodatnia — 1 fiolka (z czerwonym zamknięciem) zawierająca 1.5 ml rozcieńzonego, inaktywowanego termicznie HBsAg-ujemnego ludzkiego osocza, z dodatkiem 50 ng/ml rekombinowanego HBsAg.

Kontrola ujemna — 1 fiolka (z zielonym zamknięciem) zawierająca 1.5 ml rozcieńzonego, inaktywowanego termicznie HBsAg-ujemnego ludzkiego osocza,

Perforator — służy do przekłuwania folii pokrywającej dołki płytki rozwijającej.

Bezpieczeństwo i środki ostrożności

- Materiały na bazie surowicy ludzkiej użyte do przygotowania zestawu były przebadane w kierunku HBsAg, przeciwciał anty – HIV i przeciwciał wirusa żółtaczkowego typu C i dały wynik ujemny. Ponieważ żadna metoda nie daje całkowitej pewności braku zakażenia wirusowego, wszystkie roztwory wzorcowe (kontrola) i cały materiał pochodzenia ludzkiego powinny być traktowane jak materiał potencjalnie zakaźny.
- Stosować rękawice ochronne i odzież laboratoryjną. Postępować według obowiązujących w laboratorium zasad przy pracy z ludzką surowicą lub osoczem.
- Nie pipetować ustami.
- Cały materiał badany, zużyte zęby, płytki i inny materiał użyty przy wykonaniu badań umieścić w pojemniku na odpady biologiczne.
- Nie mieszać odczynników z różnych serii.
- Nie używać po przekroczeniu terminu ważności.

Przechowywanie i stabilność zestawu

- Zestaw powinien być transportowany w temp. 2 - 8 °C. Podczas transportu zestaw można przechowywać w temp. ≤ 30 °C nie dłużej niż 48 godz. Kontrola wewnętrzna wskazuje czy zestaw nie został uszkodzony podczas transportu.
- Zestaw przechowywać w oryginalnym opakowaniu w temp. 2-8°C.
- Nie zamrażać.
- Po otwarciu przechowywać w temp. 2 - 8 °C.
- Przy przechowywaniu zestawu po otwarciu w temp. 2 - 8 °C nie traci on stabilności do daty ważności.
- Po pierwszym użyciu grzebień i płytki nie mogą być używane więcej niż 3 razy.

Przygotowanie materiału

- Badanie można wykonać z użyciem surowicy lub osocza.
- Próbkę mogą być przechowywane przez 7 dni w temp 2– 8°C. W celu dłuższego przechowywania próbkę należy zamrozić w temp. – 20°C
- Próbkę po rozmrożeniu odwirować. Wykonać badanie z użyciem supernatantu. Unikać ponownego zamrażania i odmrażania.
- Antykoagulanty takie jak heparyna, EDTA i cytrynian sodu nie mają wpływu na wynik badania.

Procedura oznaczenia

Wymagane wyposażenie

- Precyzyjna pipeta z możliwością dozowania 75 µl i jednorazowe końcówki
- Nożyczki

- Stoper laboratoryjny

Przygotowanie zestawu

Wszystkie składniki, karty, odczynniki i próbki doprowadzić do temperatury pokojowej.

Przygotowanie płytki rozwijającej

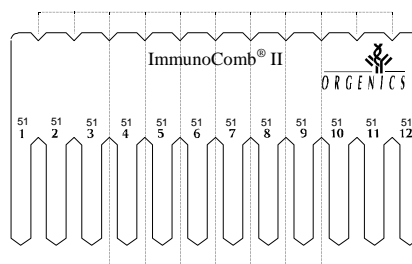
1. Inkubować płytkę przez 45 minut w cieplarni w temp.37°C. Pozostałe składniki (karty, kontrole i próbki) doprowadzić do temp. pokojowej.
2. Błat przykryć materiałem chłonny który po wykonaniu oznaczenia należy umieścić w pojemniku na odpady biologiczne.
3. Wymieszać składniki przez wstrząśnięcie płytki.

Uwaga: Nie usuwać całej folii z płytki rozwijającej, a jedynie przekłuwać przy użyciu perforatora.

Przygotowanie karty.

Uwaga: Aby zapewnić poprawne działanie testu nie należy dotykać zębów grzebienia.

1. Rozerwać opakowanie wzdłuż nacięcia i wyjąć grzebień.
2. Można użyć całej karty i płytki rozwijającej lub tylko jej część. Aby użyć tylko części karty należy:
 - a. Określić ile zębów potrzeba do zbadania próbek i kontroli. Potrzeba jeden ząb na każde badanie. Każdy ząb oznaczony jest kodem zestawu (dla HBsAg jest to kod 51), aby umożliwić identyfikację oderwanych zębów.
 - b. Zgiąć i przełamać grzebień lub przeciąć nożyczkami (patrz Rysunek 4) aby oderwać odpowiednia ilość zębów (ilość próbek + dwie kontrole)
 - c. Nieużywaną część karty odłożyć do aluminiowej torebki (nie usuwać pochłaniacza wilgoci). **Zamknąć szczelnie torebkę** aby nie dostała się do niego wilgoć np. spiąć spinaczem. Przechowywać grzebień w oryginalnym pudełku w temp. 2°-8°C.



Rysunek 4. Przerwanie karty

Wykonanie testu

Uwaga:

- **Inkubować** w temp. 37°C! Przemycanie powinno być wykonane w temp. pokojowej (22°-26°C).
 - Opisany poniżej limit detekcji testu wykonanego zgodnie z poniższą procedurą wynosi 0.5 ng/ml.
- Wiązanie antygeny (Rząd A płytki rozwijającej)
3. Odmierzyć pipetą 75 µl próbki. Przekłuć perforatorem folię nad jednym dołkiem w rzędzie A i zapipetować próbkę na dno dołka. Wymieszać przez powtórne zaciągnięcie i wypuszczenie roztworu. Usunąć końcówkę pipety.
 4. Powtórzyć krok opisany w punkcie 3 dla innych próbek w tym również dla kontroli: dodatniej i ujemnej. Każdą próbkę i kontrolki dozować do nowego dołka rzędu A przy użyciu nowej końcówki.
 5. a. Umieścić grzebień (**drukowaną** stroną do siebie) w dołkach rzędu A zawierających próbki i kontrole. **Zamieszać:** Kilkakrotnie wyjąć i włożyć zęby grzebienia w dołki. b. Pozostawić grzebień w rzędzie A i inkubować przez 120 minut w 37°C. Włączyć stoper. Pod koniec 120 minut nakłuć folię w rzędzie B używając perforatora. Nie otwierać większej ilości dołków niż jest to konieczne. c. Po upływie 120 minut, wyjąć grzebień z rzędu A i usunąć nadmiar płynu przy użyciu materiału absorbującego. Nie dotykać przedniej powierzchni zębów.

Pierwsze płukanie (Rząd B)

6. Włożyć grzebień w dołki rzędu B. **Wstrząsanie:** W celu dokładnego wymycia energicznie wyjmować i wkładać grzebień w dołki przez co najmniej 10 sekund. W przeciągu 2 minut powtórzyć wstrząsanie kilkakrotnie. W międzyczasie naciąć folię nad dołkami rzędu C. Po 2 minutach, wyjąć grzebień i usunąć nadmiar płynu postępując według kroku opisanego w punkcie 5c.

Wiązanie znakowanego białka przeciwciała anti-HBs (Rząd C)

- Włożyć kartę w dołki w rzędzie C. **Wymieszać** według kroku opisanego w punkcie 5a. Inkubować przez 30 minut w 37°C. Włączyć stoper. Naciąć folię w rzędzie D. Po 30 minutach, wyjąć kartę i **usunąć nadmiar płynu**.

Wiązanie kompleksu streptawidyna - fosfataza alkaliczna (Rząd D)

- Włożyć kartę w dołki rzędu D. **Zamieszać**. Inkubować przez 20 minut (włączyć stoper) w temp. 37°C. Naciąć folię w rzędzie E. Po 20 minutach, wyjąć kartę i **usunąć nadmiar płynu**.

Drugie płukanie (Rząd E)

- Włożyć kartę w dołki w rzędzie E. Wielokrotnie wstrząsać w czasie 2 minut, według kroku opisanego w punkcie 6. W międzyczasie naciąć folię w rzędzie F. Po 2 minutach, wyjąć kartę i **usunąć nadmiar płynu**.

Reakcja barwna (Rząd F)

- Włożyć kartę w dołki w rzędzie F. **Zamieszać**. Inkubować dokładnie 10 minut (włączyć stoper) w temp. 37°C. Po 10 minutach, wyjąć kartę.

Zatrzymanie reakcji (Rząd E)

- Ponownie włożyć kartę do rzędu E. Po 1 minucie, wyjąć grzebień i pozostawić na powietrzu do wyschnięcia.

Przechowywanie niewykorzystanej części zestawu.

Płytki rozwijająca

Jeżeli nie zużyto wszystkich dołków płytki rozwijającej, to można ją przechować do późniejszych oznaczeń:

- Zużyte dołki zalepić szeroką taśmą samoprzylepną tak, aby nic nie doprowadziło do wylania ich zawartości nawet przy odwróceniu płytki do góry dnem.

Inne materiały z zestawu

- Włożyć pozostałe składniki zestawu: zabezpieczoną płytkę rozwijającą, karty, perforatory, kontrole i instrukcje do oryginalnego opakowania. Przechowywać w temp. 2°–8°C.

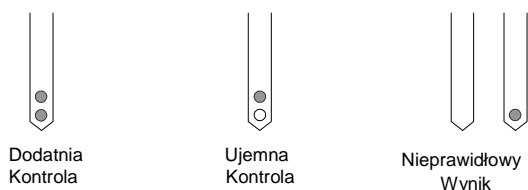
Wyniki testu

Walidacja

Aby potwierdzić właściwe działanie testu i mieć pewność że wyniki są prawidłowe poniższe trzy warunki muszą być spełnione: (patrz Obrazek 5):

- Wynikiem **kontroli dodatniej** muszą być **dwie** plamki na zębie grzebienia.
- Wynikiem **kontroli ujemnej** musi być **górną** plamka (Wewnętrzna Kontrola). Dolna plamka nie pojawi się lub będzie bardzo błada.
- W wyniku każdej próbki badanej musi pojawić się **górną** plamka. (Kontrola Wewnętrzna).

Jeżeli któryś z powyższych warunków nie jest spełniony oznacza to, że wyniki są niewiarygodne i należy powtórzyć badanie próbek i kontroli.

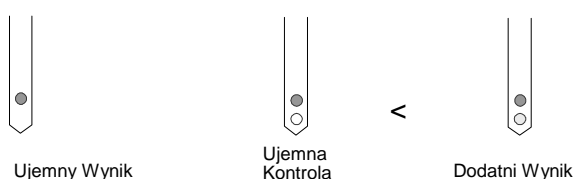


Rysunek 5. Walidacja testu

Interpretacja wyników

Porównać intensywność zabarwienia dolnego pola reakcyjnego (na zębie) każdej próbki z dolnym polem kontroli **ujemnej** (Rysunek 6).

- Plamka o **intensywniejszym** zabarwieniu niż plamka kontroli **ujemnej** oznacza wynik **dodatni** - stężenie HBsAg ≥ 0.5 ng/ml.
- Brak plamki lub plamka o intensywności **mniej** lub **równą** intensywności plamki kontroli **ujemnej** oznacza wynik **ujemny**.



Rysunek 6. Wyniki testu

Dokumentacja wyników.

Karty można przechowywać jako dokumentację wyników, gdyż pojawiające się na nich zabarwienie jest stabilne

Ograniczenia

Dodatni wynik testu ImmunoComb® II HBsAg może wskazywać na obecność antygenu powierzchniowego wirusa żółtaczkowego typu B. Jednakże, tak jak w innych testach przeznaczonych do diagnostyki *in vitro*, wyniki muszą być oceniane w powiązaniu z objawami, historią kliniczną i wynikami innych badań pacjenta oraz potwierdzone testem potwierdzającym.

Ocena jakości testu

Czułość i specyficzność zestawu ImmunoComb® II HBsAg została przebadana na panelu próbek surowicy w porównaniu do referencyjnej metody radioimmunologicznej.

Panel zawierał 196 HBsAg-pozytywnych próbek pacjentów z ostrą albo chroniczną infekcją HBV, i 248 HBsAg-negatywnych próbek. Wyniki są przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki testu

Metoda referencyjna	ImmunoComb® II HBsAg	
	Pozytywne	Negatywne
Pozytywne	196	0
Negatywne	3	245

- Czułość – 100 %
- Specyficzność – 99.25 % (oparte na 1748 próbkach od dawców krwi)

Dodatkowe badania przeprowadzone na panelu dostarczonej przez ADM - Francja, wykazały, że granica detekcji w próbkach surowicy wynosi 0.5 ng/ml.

Powtarzalność

Wybrano losowo dziesięć kart z różnych partii serii produkcyjnych. Jedną próbkę o stężeniu HBsAg 0.5 ng / ml przebadano 12 razy na każdej karcie. We wszystkich przypadkach wynik był dodatni.

Odtwarzalność

Cztery próbki o różnych podtypach HBsAg i o różnym stężeniu przebadano na grzebieniach z trzech różnych serii produkcyjnych. W każdym przypadku otrzymano wynik dodatni.

Reakcja krzyżowa

Nie ma istotnego wpływu na wynik testu obecność w próbkach antygenu korowego wirusa żółtaczkowego typu B oraz przeciwciał przeciwko temu wirusowi.

Również nie stwierdzono reakcji krzyżowych w próbkach dodatnich dla innych chorób takich jak różyczka, HIV, żółtaczka zakaźna typu C, cytomegalowirus i toksoplazmoza.


Interferencje

Brak interferencji ze strony hemolizy (do 10 mg/ml), lipemii (cholesterol do 281.6 mg/dL; trójglicerydy do 381.0 mg/dL) i stężenia bilirubiny (do 20 mg/dl).












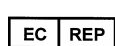




* Szczegółowe dane dostępne na życzenie.

Bibliografia

- Cadranel, J.F., Caron, C., Collot, G., Van Batten, C., Dumouchel, P. (1999) Hepatitis B: epidemiology, natural history, biology, treatment monitoring. *Phatol Biol (Paris)*. 47(9): 917-927.
- Hollinger, F.B., Lemon, S.M., Margolis, H.S., eds. (1991) *Viral hepatitis and liver disease*. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Mahoney, F.J. (1999) Update on diagnosis, management and prevention of Hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 12(2): 351-366.
- Milich, D.R. (1997) Pathobiology of acute and chronic hepatitis B virus infection: an introduction. *J Viral Hepat* 4 Suppl 2: 25-30.
- Pirovino, M. (1998) Hepatitis B: clinical manifestations, diagnosis and medical management. *Soz Praventivmed* 43 Suppl 1: S 14-17, S 88-91.
- Sjogren, M.H. (1994) Serologic diagnosis of viral hepatitis. *Gastroentol Clin North Am* 23(3): 457-477.
- Weston, S.R., Martin, P. (2001) Serological and molecular testing in viral hepatitis: an update. *Can J Gastroenterol* 15(3): 177-184.
- Zuckerman, A., Zuckerman, J., Harrison, T., (1993) *Viral hepatitis – the alphabet so far*. *Virus and Life*. 6: 2-8.

Manufacturer:  ORGENICS P.O.Box 360 Yavne 70650, Israel http://www.orgenics.com Tel: ++ 972 8 942 92 01 Fax: ++ 972 8 943 87 58	Authorised Representative in EU: PBS-Orgenics 19, rue Lambrechts-BP41 92404 Courbevoie Cedex, France Tel: 01 41 99 92 92 Fax: 01 41 99 92 95 Version: 60451002/E15-CE (12/2006)
--	--

Objaśnienia symboli graficznych

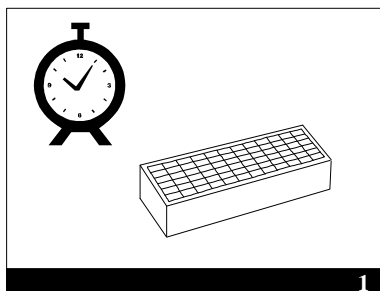
	Grzebień ImmunoComb
	Płytki Rozwijająca
	Kontrola dodatnia
	Kontrola ujemna
	Perforator
	Przed użyciem zapoznać się z instrukcją użycia
	Zapoznać się z załączonymi dokumentami
	Wyrób do do diagnostyki in vitro
	Temperatura przechowywania
	Ilość oznaczeń
	Producent
	Autoryzowany przedstawiciel w Europie
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Data ważności
	Numer serii

Importer

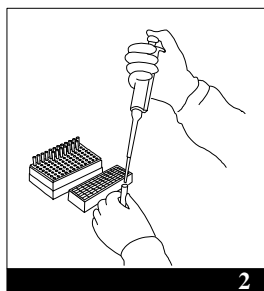
Alpha Diagnostics Sp. z o.o.
ul. Gabriela 2, 01 - 347 Warszawa
Tel. (22) 631 40 13; fax (22) 632 42 11

Magazyn; Produkcja; Kontrola Jakości; Serwis
ul. Stępińska 22/30, 00 - 739 Warszawa
Tel. (22) 631 42 27; fax (22) 631 48 23
e-mail: ad@alphadiag.com.pl
www.alphadiag.com.pl

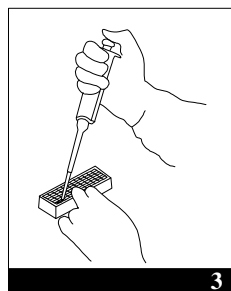
Skrócona instrukcja



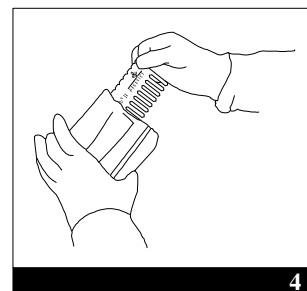
1
Wstępna inkubacja płytki rozwijającej: 45 minut w temp. 37°C



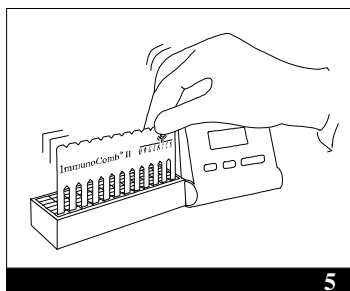
2
Pobieranie próbek i kontroltek.



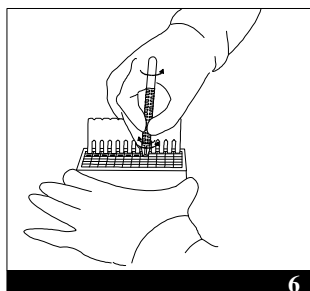
3
Dodawanie próbek i kontroli do rzędu A.



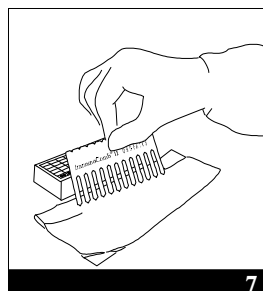
4
Wymywanie grzebienia z opakowania



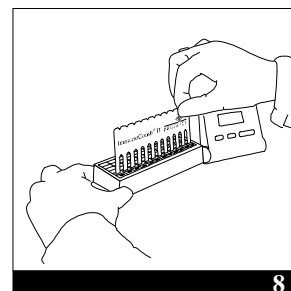
5
Wkładanie grzebienia i mieszanie w rzędzie A. Inkubacja w temp. 37°C



6
Otwieranie rzędu B



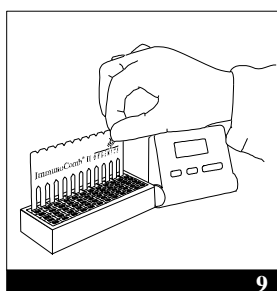
7
Odsączenie nadmiaru płynu z zębów.



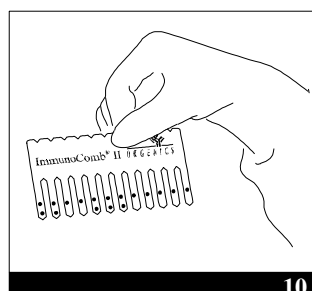
8
Wkładanie grzebienia i wstrząsanie w rzędzie B. Inkubacja

Po wymieszaniu/wytrząsaniu i inkubacji w rzędach C, D i E

.....



9
Reakcja barwna w rzędzie F



10
Wynik

Skrócona procedura testu

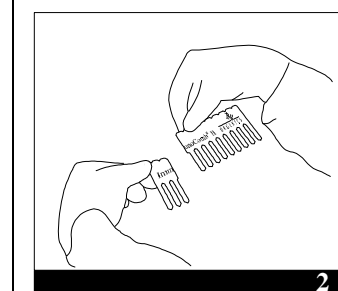
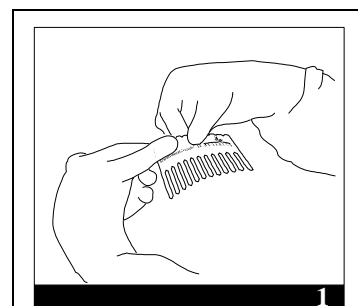
Poniższa skrócona instrukcja jest zalecana dla doświadczonych użytkowników testu ImmunoComb® II HBsAg.

(Szczegółową instrukcję zamieszczono w punkcie Procedura badania)

1. Inkubować płytkę rozwijającą w cieplarni w temp. 37°C przez 45 minut.
2. Rozpipetować po 75 µl próbek i kontroli do dołków w rzędzie A płytki rozwijającej i wymieszać.
3. Włożyć grzebień do rzędu A i kontynuować postępując według Tabeli 1.

Table 1. Streszczona procedura testu

Step	Row	Proceed as follows
Wiązanie antygenu	A	Mieszać; inkubować 2 godziny w temp 37°C; usunąć nadmiar płynu.
Płukanie	B	Wsztrząnąć; inkubować 2 minuty; usunąć nadmiar płynu
Wbudowywanie przeciwciała anti-HBs znakowanego biotyną	C	Mieszać; inkubować 30 minut w temp. 37°C; usunąć nadmiar płynu.
Wbudowywanie kompleksu streptawidyna / fosfataza alkaliczna	D	Mieszać; inkubować 20 minut w temp. 37°C; usunąć nadmiar płynu .
Płukanie	E	Wsztrząnąć; inkubować 2 minuty; usunąć nadmiar płynu.
Barwna reakcja	F	Mieszać; inkubować 10 minut w temp. 37°C.
Przerwanie reakcji	E	Inkubować 1 minutę; suszyć na powietrzu.



1
2
Zgięcie i przełamanie grzebienia