



# ImmunoComb® II

## HCV



Código:60455002

Formato: 3 x 12 pruebas

### Para Diagnóstico *in vitro* únicamente

#### Propósito de Uso

El kit ImmunoComb® II HCV es una prueba rápida para la detección cualitativa de anticuerpos IgG contra el virus de la hepatitis C (HCV) en suero o plasma humano. Treinta y seis pruebas pueden ser realizadas con un kit.

#### Introducción

El virus de la Hepatitis C fue identificado en 1989 como el agente etiológico de la hepatitis de post-transfusión del tipo no-A no-B. El virus está compuesto de un genoma de 10 Kb de RNA monolineal, protegido por un nucleocápside y envuelto en una membrana de lipoproteína. El genoma de HCV codifica proteínas estructurales (núcleo y envoltorio) y proteínas no-estructurales (de NS2 a NS5). En base a sus características morfológicas y a su estructura, el virus fue clasificado como miembro de las *Flaviviridae*.

La transmisión del HCV se produce por vía parenteral predominantemente, principalmente como resultado de una transfusión de sangre, la exposición a muestras de sangre y sus derivados, o el contacto accidental con equipos médicos contaminados. Estudios recientes indican la posibilidad de la transmisión sexual como un medio de transmisión potencial.

Las tasas de seroprevalencia entre las poblaciones en riesgo varían entre 0.18 y 0.8% en los donantes de sangre, y 9% en los pacientes de diálisis, hasta 50% en los drogadictos que se inyectan y 70% en los enfermos de hemofilia.

La infección de HCV consiste usualmente en un período de incubación de 5 a 12 semanas, seguido de una enfermedad asintomática o leve-aguda, parecida a los síntomas de la infección aguda de hepatitis A o B. Hasta un 50% de los casos agudos progresan rápidamente y pasan a la fase crónica de la enfermedad.

Las manifestaciones clínicas de las infecciones crónicas de HCV son usualmente leves y se limitan a la astenia. Sin embargo, la enfermedad puede finalmente desarrollar cirrosis y hepatocarcinoma.

El diagnóstico de HCV generalmente fue establecido por medio de altos niveles de alanina amino transminasa (ALT), persistiendo por al menos 6 meses en la ausencia de otras causas de citólisis crónica. La identificación del virus de la hepatitis C como el agente etiológico ha facilitado el diagnóstico por métodos tales como los ensayos inmunológicos de la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

El kit ImmunoComb® II HCV es una prueba sensible y rápida de la detección diferencial de anticuerpos de HCV dirigidos contra proteínas virales estructurales y no-estructurales. El kit es una herramienta útil para el diagnóstico rápido de los presuntos portadores de HCV, así como en los muestreos en los bancos de sangre.

### Principio de la Prueba

La prueba ImmunoComb® II HCV es un ensayo inmuno-enzimático indirecto de fase sólida (EIA). La fase sólida es un Peine con 12 proyecciones ("dientes"). Cada diente está sensibilizado en tres áreas reactivas:

- punto superior — inmunoglobulina humana (Control Interno).
- punto medio — antígeno nuclear de HCV.
- punto inferior — antígenos no estructurales de HCV.

La Bandeja de Desarrollo tiene 6 filas (A-F) de 12 pocillos cada una. Cada fila contiene una solución reactiva lista para ser usada en cada etapa del ensayo. La prueba es realizada en etapas, pasando el Peine de una fila a otra, con un período de incubación en cada etapa.

Para comenzar la prueba, se agregan muestras de suero o plasma al diluyente en los pocillos de la fila A de la Bandeja de Desarrollo. Luego se inserta el Peine en los pocillos de la fila A. Los anticuerpos anti-HCV, en caso de estar presentes en las muestras, se unirán específicamente a los antígenos de HCV en los puntos inferior y medio de los dientes del Peine (Figura 1). Los componentes no unidos son eliminados con un lavado en la fila B. En la fila C, el IgG anti-HCV capturado en los dientes, y la inmunoglobulina humana en los puntos superiores (Control Interno) reaccionan con los anticuerpos anti-IgG humano marcados con fosfatasa alcalina (FA). En las dos filas siguientes, los componentes no unidos son eliminados mediante un lavado. En la fila F, la fosfatasa alcalina unida reacciona con componentes cromogénicos. Los resultados son visibles como puntos de color azul grisáceo en la superficie del diente del Peine.

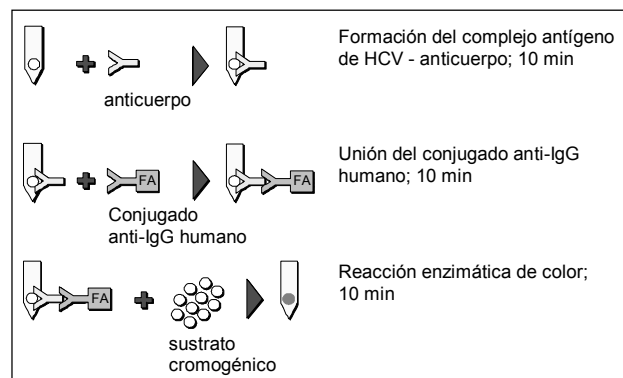


Figura 1. Principio de la Prueba

El kit incluye un Control Positivo (IgG anti-HCV) y un Control Negativo, que deben incluirse cada vez que se realiza la prueba. Al término de esta, el diente usado con el Control Positivo debe mostrar 3 puntos de color azul grisáceo y el diente usado con el Control Negativo debe mostrar solamente el punto superior. Este punto también debe aparecer en los demás dientes para confirmar que el kit funciona apropiadamente y que la prueba fue realizada correctamente.

### Contenido del Kit

#### Peines

El kit contiene 3 Peines de plástico. Cada Peine tiene 12 dientes, uno para cada prueba (Figura 2). Cada diente es sensibilizado en tres áreas reactivas:

- punto superior — inmunoglobulina humana (Control Interno)
- punto medio — antígeno nuclear de HCV
- punto inferior — antígenos no estructurales de HCV (NS3, NS4 y NS5)

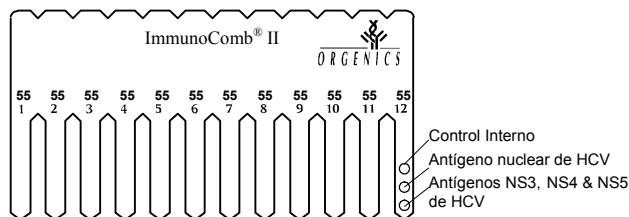


Figura 2. Peine

Los Peines son suministrados en empaques de aluminio que contienen una bolsa desecante.

## Bandejas de Desarrollo

El kit contiene 3 Bandejas de Desarrollo, cubiertas con papel de aluminio. Cada Bandeja de Desarrollo (Figura 3) contiene todos los reactivos necesarios para la prueba. La Bandeja de Desarrollo consiste de 6 filas (A-F) de 12 pocillos cada una. Los contenidos de cada fila son los siguientes:

- Fila A diluyente de la muestra
- Fila B solución de lavado
- Fila C anticuerpos de cabra anti-IgG humano marcados con fosfatasa alcalina
- Fila D solución de lavado
- Fila E solución de lavado
- Fila F solución de sustrato cromogénico conteniendo 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitro azul tetrazolio (NBT)

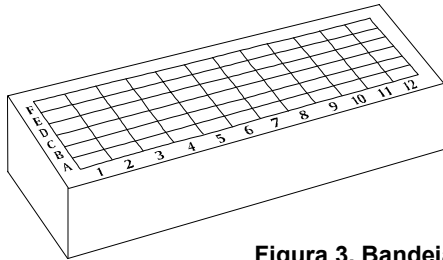


Figura 3. Bandeja de Desarrollo

**Control Positivo** — 1 frasco (tapa roja) de 0.75 ml de plasma humano diluido, positivo para anticuerpos anti-HCV, inactivado con calor.

**Control Negativo** — 1 frasco (tapa verde) de 0.75 ml de plasma humano diluido, inactivado con calor, negativo para anticuerpos contra HCV.

**Perforador** — para perforar el papel aluminio que cubre los pocillos de la Bandeja de Desarrollo

## Seguridad y Precauciones

- Maneje el control positivo como si fuera potencialmente infeccioso, aunque haya sido inactivado.
- Todos los otros materiales de origen humano usados en la preparación de los controles pasaron pruebas que demostraron que no son reactivos al antígeno de superficie de la hepatitis B, así como a anticuerpos de HIV o el virus de la hepatitis C. Ya que ningún método de prueba puede garantizar por completo la ausencia de contaminación viral, todas las soluciones de referencia y todas las muestras humanas deben ser manejadas como si fueran potencialmente infecciosas.
- Use guantes quirúrgicos y ropas de laboratorio. Siga los procedimientos de laboratorio aceptados para el trabajo con suero o plasma humano.
- No use la pipeta aspirando con la boca.
- Deseche todas las muestras, Peines usados\*, Bandejas de Desarrollo y otros materiales usados con el kit como desechos biocontaminantes.
- No mezcle reactivos de lotes diferentes.
- No use este kit después de la fecha de caducidad.

## Almacenamiento y Estabilidad del Kit

- El kit es transportado entre 2-8 °C. Durante el transporte el kit debe mantenerse entre  $\leq 30$  °C por cortos períodos de tiempo, no excediendo un total de 48 horas. Los controles internos indican que el kit no se ha dañado durante el transporte.
- Almacene el kit en su caja original de 2 – 8 °C.
- No congele el kit.
- Después de abrir el kit por primera vez es estable hasta la fecha de expiración del kit, cuando se almacena de 2 - 8 °C.
- El desempeño del kit después de abrirlo por primera vez es estable hasta la fecha de expiración del kit, cuando se almacena de 2 - 8 °C.
- Después del primer uso, el peine y la bandeja no deben ser usados por más de tres veces.

## Manejo de las Muestras

- Es posible usar suero o plasma en la prueba.
- Las muestras pueden ser almacenadas por 7 días a temperaturas de 2° a 8°C antes de la prueba. Para almacenar las muestras por más de 7 días, congélelas a -20°C o a temperaturas más bajas.

\* A menos que sea archivado para consulta posterior

- Después de descongelar las muestras de suero, centrifúguelas. Use el sobrenadante para la prueba. Evite congelar y descongelar repetidamente.
- Los anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato sódico no han mostrado tener efecto sobre los resultados del test.
- Anticoagulantes tales como heparina, EDTA y Citrato de Sodio no tienen ningún efecto en los resultados de la prueba.

## Procedimiento de la Prueba

### Equipo Necesario (no proporcionado)

- Pipetas de precisión con puntas desechables y capacidad de 50  $\mu$ l
- Tijeras
- Cronómetro de Laboratorio o reloj

### Preparación de la Prueba

Lleve todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente y realice la prueba a temperatura ambiente (22°-26°C).

#### Preparación de la Bandeja de Desarrollo

1. Incube la Bandeja de Desarrollo en una incubadora a 37°C durante 20 minutos; o deje a temperatura ambiente (22°-26°C) durante 3 horas.
2. Cubra la mesa de trabajo con papel absorbente, para ser desechado como desecho biocontaminante al concluir la prueba.
3. Agite vigorosamente la bandejas de desarrollo antes de cada prueba.

**Nota:** No retire la cubierta de aluminio de la Bandeja de Desarrollo; rómpala usando la punta desechable de la pipeta o el perforador, sólo cuando las instrucciones de la prueba así lo indiquen.

#### Preparación del Peine

**Precaución:** para asegurar el funcionamiento apropiado de la prueba, no toque los dientes del Peine.

1. Abra el empaque de aluminio por el borde perforado. Retire el Peine.
2. Es posible utilizar todo el Peine y la Bandeja de Desarrollo o una parte. Para utilizar parte del Peine:
  - a. Determine cuantos dientes va a necesitar para analizar las muestras y los controles. Se necesita un diente para cada prueba. Cada diente tiene impreso el número de código del kit, "55", para permitir la identificación de los dientes sueltos.
  - b. Doble y rompa verticalmente el Peine, o córtelo con tijeras (ver Figura 4) para separar el número requerido para las pruebas (Nro. de pruebas mas 2 controles).
  - c. Vuelva a meter la porción no utilizada del Peine en el empaque de aluminio (con la bolsa desecante). **Cierre bien el empaque** (con un clip, por ejemplo) a fin de mantenerlo seco. Almacene el Peine en la caja original del kit a temperaturas de 2° a 8°C para su uso posterior.

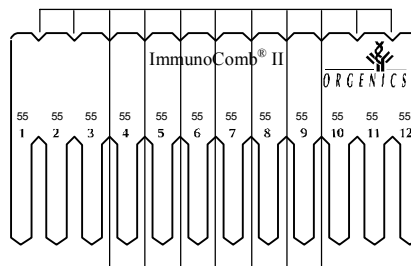


Figura 4. Fraccionamiento del Peine

## Instrucciones de la Prueba

### Reacción Antígeno-Anticuerpo (Fila A de la Bandeja de Desarrollo)

1. Tome 50  $\mu$ l de la muestra con la pipeta. Perfore con la punta de la pipeta o el perforador la cubierta de papel de aluminio de un pocillo en la fila A de la Bandeja de Desarrollo y vierta la muestra en el fondo del pocillo. **Mezcle** la prueba vigorosamente vaciando y rellenando repetidamente la solución con la pipeta un mínimo de 6 veces. Deseche la punta de la pipeta.
2. Repita el paso 1 para las demás muestras, incluyendo un control positivo y uno negativo provistos en el kit. Use un nuevo pocillo en la fila A y cambie la punta de la pipeta para cada muestra o control..
3.
  - a. Inserte el Peine (con el lado **impreso** hacia Ud.) en los pocillos de la fila A que contienen las muestras y los controles. **Mezcle:** Retire e inserte el Peine en los pocillos varias veces.
  - b. Deje el Peine en la fila A durante exactamente 10 minutos. Active el cronómetro. Mezclar periódicamente durante la incubación sacando e insertando el peine en las filas. Hacia el final de los 10 minutos, perfore el papel aluminio en la fila B usando el perforador. No abra más pocillos de los necesarios.
  - c. Al cumplirse los 10 minutos, saque el Peine de la fila A.

**Absorba el líquido adherido** a las puntas de los dientes apoyandolos sobre un papel absorbente limpio. No toque la superficie frontal del diente.

#### Primer Lavado (Fila B)

4. Inserte el Peine en los pocillos de la fila B. **Agite:** inserte y retire vigorosamente el Peine en los pocillos durante al menos 10 segundos para que quede bien lavado. Repita el lavado varias veces agitando en el transcurso de 2 minutos; mientras tanto, perfore el papel aluminio de la fila C. Después de dos minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido** como en el paso 3c.

#### Unión del Conjugado (Fila C)

5. Inserte el Peine en los pocillos de la fila C. **Mezcle** como en el paso 3a. Programe el cronómetro para 10 minutos. **Mezcle** como en el paso 3b. Mezcle periódicamente durante la incubación. Perfore el papel aluminio de la fila D. Después de 10 minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido**.

#### Segundo Lavado (Fila D)

6. Inserte el Peine en los pocillos de la fila D. **Agite** como en el paso 4. Espere 2 minutos; mientras tanto, perfore el papel aluminio en la fila E. Después de dos minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido**.

#### Tercer Lavado (Fila E)

7. Inserte el Peine en los pocillos de la fila E. **Agite.** Espere 2 minutos; mientras tanto, perfore el papel aluminio de la fila F. Después de dos minutos, retire el Peine y **absorba el líquido adherido**.

#### Reacción de Color (Fila F)

8. Inserte el Peine en los pocillos de la fila F. **Mezcle.** Programe el cronómetro para 10 minutos. Después de 10 minutos, retire el Peine.

#### Detención de la Reacción (Fila E)

9. Inserte de nuevo el Peine en la fila E. Después de un minuto, retire el Peine y déjelo secar al aire.

## Almacenamiento de Partes No Usadas del Kit

#### Bandeja de Desarrollo

Si no usó todos los pocillos de la Bandeja de Desarrollo, puede almacenarla para ser usada posteriormente:

- Selle los pocillos usados con cinta adhesiva ancha a fin de que nada se derrame fuera de los pocillos, incluso en caso de que la Bandeja de Desarrollo sea volcada.

#### Otros Materiales del Kit

- Vuelva a colocar la(s) Bandeja(s) de Desarrollo, Peine(s), perforador, controles e instrucciones en la caja original del kit y almacene a temperaturas de 2° a 8°C.

## Resultados de la Prueba

### Validación

A fin de confirmar el funcionamiento correcto de la prueba y demostrar que los resultados son válidos, deben cumplirse las siguientes tres condiciones (ver Figura 5):

1. El **Control Positivo** debe producir **tres** puntos en el diente del Peine.
2. El **Control Negativo** debe producir un punto **superior** (Control Interno) y no otros puntos.
3. Cada **muestra analizada** debe producir un punto **superior** (Control Interno).

Si cualquiera de estas tres condiciones no se cumple, los resultados de la prueba no son válidos y las muestras y controles deben ser reexaminados.

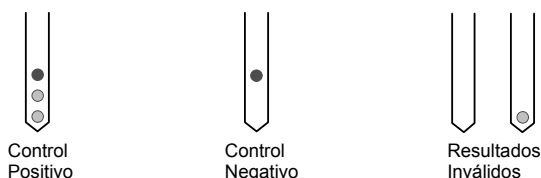


Figure 5. Validación de la Prueba

### Interpretación de los Resultados

1. La aparición sobre el diente de solo el punto superior (Control Interno) indica que la muestra no es reactiva para anticuerpos contra HCV.
2. La aparición sobre el diente de cualquier punto débil sobre el punto medio medio (core) y el punto inferior (NS) induca que la muestra es reactiva para anticuerpos contra HCV.
3. La aparición sobre el diente de un punto muy tenue solo en el punto medio (core) puede corresponder a una reacción no específica para la presencia de anticuerpos contra HCV o una infección temprana y debe ser investigada nuevamente.

4. La aparición sobre el diente de un punto muy tenue, solo en el punto inferior (NS) puede indicar la presencia de anticuerpos contra HCV y debe ser investigada nuevamente. (figura 6b)

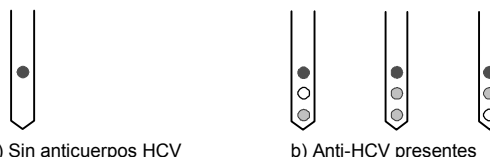


Figure 6. Resultados de la Prueba

#### Documentación de los Resultados

Debido a que el color que aparece en el Peine es estable, es posible archivar los Peines para consulta posterior.

## Limitaciones

El kit ImmunoComb® II HCV es una prueba de tamizaje. La presencia de anticuerpos contra HCV en la muestra analizada debe ser confirmada en una prueba confirmatoria. Debido a que la producción de anticuerpos contra HCV puede retrasarse, la falta de reacción a esta prueba no debe ser considerada como evidencia concluyente de que el paciente no ha sido expuesto o infectado con HCV. Como ocurre con otras pruebas especiales para ser usadas en diagnóstico *in vitro*, los resultados de la prueba deben ser evaluados en relación a todos los síntomas, historial clínico y otros resultados de laboratorio del paciente. Puede observarse reacción cruzada con Factor Reumatoideo.

## Características del Ensayo\*

A. La especificidad del kit ImmunoComb® II HCV fue evaluada en 1398 muestras de suero. Los resultados son resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la Prueba

Tipos de Muestras	No. de Muestras	Especificidad
Mujeres Embarazadas	162	100 %
Pacientes	224	99.5 %
Donantes de Sangre	1012	99.01 %

- Estos resultados muestran que el kit tiene 99.01 % de especificidad en muestras de donantes de sangre.

B. La sensibilidad de el Kit ImmunoComb® II HCV fue evaluada en 397 muestras de suero de diferentes genotipos de pacientes con hepatitis C crónica. Los métodos de referencia usados fueron pruebas de ELISA de 3<sup>rd</sup> generación y PCR. Los resultados son resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de la Prueba

No. De muestras	Genotipo	Sensibilidad
224	1	100 %
33	2	100 %
88	3a	100 %
1	3a+4c/4d	100 %
40	4	100 %
11	5a	100 %

- Sensibilidad — 100 %

C. La detección de seroconversión de muestras con el kit ImmunoComb® II HCV fue evaluada en 23 paneles de seroconversión. Los resultados muestran que más del 50 % de las muestras fueron detectadas al mismo tiempo como la prueba de ELISA más sensible.

### Repetibilidad

Un suero positivo fue analizado 12 veces en 10 peines, y los resultados fueron leídos visualmente. En todos los casos, el suero positivo fue detectado.

### Reproducibilidad

Tres sueros positivos fueron analizados en 10 kits por separado, y los resultados fueron leídos visualmente. En todos los casos, los sueros positivos fueron detectados.

\* Datos detallados disponibles

**Reacción Cruzada** no se encontró significativa con muestras positivas para otras enfermedades tales como virus de la Hepatitis A, HBV, HDV, Citomegalovirus, HSV I&II, EBV y Toxoplasma. Reacción cruzada con muestras positivas para enfermedades autoinmunes incluyendo Anticuerpos Antinucleares (ANA) tampoco se encontró significativo.

**Interferencia**

No se observó interferencia con muestras hemolisadas (hemoglobina hasta 10 mg/ml), lipémicas (Colesterol hasta 281.6 mg/dL; Triglicéridos hasta 381.0 mg/dL) y bilirrubina alta (hasta 20 mg/dl).

**Bibliografía**

**Choo Q-L, et al.** 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-born non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.

**Chung HT, Lee JSK, Lok ASF.** 1993. Prevention of posttransfusion hepatitis B by screening for antibody to hepatitis C virus and antibody to HBcAg. *Hepatology* 18:1045-1049.

**Claeys H, Volckaerts A, De Beenhouwer H, Vermynen C.** 1992. Association of hepatitis C virus with the occurrence of hepatitis C virus core antibodies. *J Med Virol* 36:259-264.

**Cuthbert, J.A.** 1994. Hepatitis C: Progress and Problems. *Clin Microbiol Rev* 7:505-532.

**Herrera JL.** 1994. Serological diagnosis of viral hepatitis. *S Med J* 87:677-684.

**Hollinger FB.** 1991. Non-A, non-B hepatitis viruses. In: *Viral Hepatitis*. (Hollinger FB, Purcell, RH, Robinson WS, Gerin JL, Ticehurst J, eds.) Raven Press, New York. pp. 139-173.

**Kuo G, et al.** 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. *Science* 244:362-364.

**Liang TJ, et al.** 1993. Viral pathogenesis of hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 18:1326-1333.


**Swenson PD.** 1991. Hepatitis viruses. In: *Manual of Clinical Microbiology*, (Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds.) Fifth edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 959-983.

**Wiber C.** 1993. Development and use of laboratory tests for hepatitis C infection: A Review. *J Clin Immunoassay* 16:204-207.

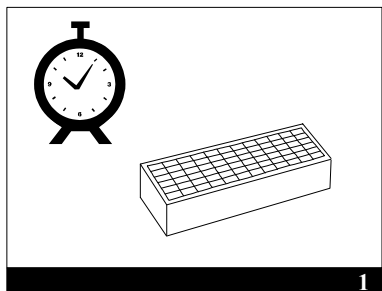
**Yoshikawa A et al.** 1992. Serodiagnosis of hepatitis C virus infection by ELISA for antibodies against the putative core protein (p20<sup>c</sup>) expressed in *Escherichia coli*. *J Immunol Meth* 148:143-150.

**Leyenda de los símbolos**

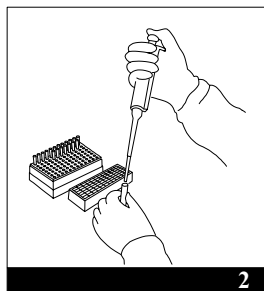
	ImmunoComb® tarjeta
	Bandejas de Desarrollo
	Control positivo
	Control negativo
	Perforador
	Consulte las instrucciones de uso
	Atención, ver instrucciones de uso
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Limite de temperatura
	Contenido suficiente para n ensayos
	Fabricante
	Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Número de catálogo
	Código de lote
	Fecha de caducidad
	Número de serie

<p><b>Fabricante:</b></p>  <p><b>ORGENICS</b></p> <p>Orgenics Ltd., part of the Inverness Medical Innovations Group. P.O.B 360 Yavne 70650, Israel Tel: ++ 972 8 942 92 01 Fax: ++ 972 8 943 87 58</p>	<p><b>Representante Autorizado en EU:</b></p> <p>Orgenics France S.A. 19, rue Lambrechts 92400 Courbevoie, France Tel: +33-1 41 99 92 90 Fax: +33-1 41 99 92 95</p> <p><b>Version: 60455002/S13/OR (04/2007)</b></p>
---	--

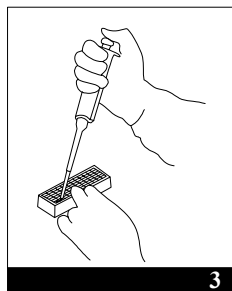
## Resumen de los Principales Procedimientos de la Prueba



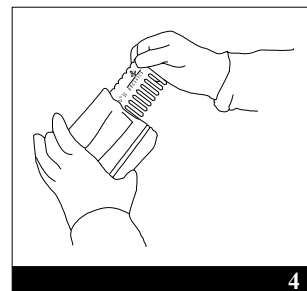
**Preincubación de la Bandeja de Desarrollo: 3 hrs. a temperatura ambiente o 20 min. a 37°C**



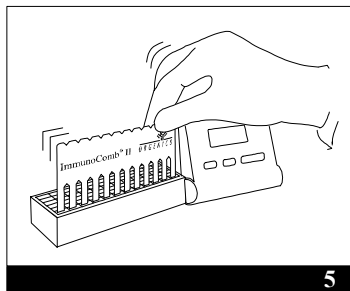
**Agiter la bandeja antes de cada prueba. Tomar las muestras y controles**



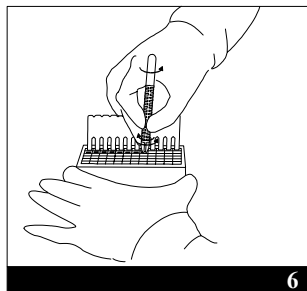
**Agregar muestras y controles a la fila A. Mezcle vigorosamente**



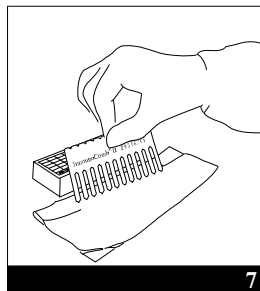
**Sacar el Peine del empaque**



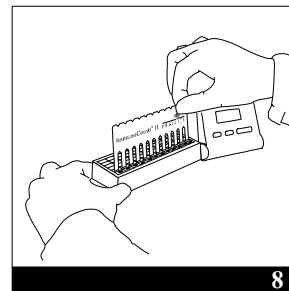
**Insertar el Peine y mezclar en la fila A. Incubar. Mezcle periódicamente durante la incubación.**



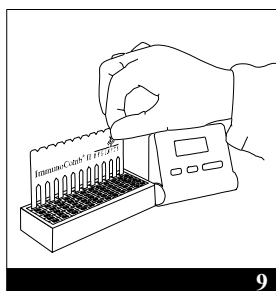
**Perforar la fila B**



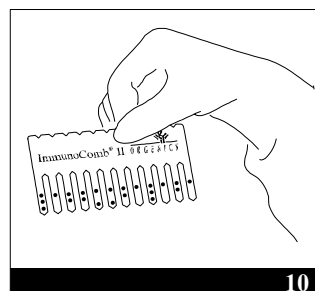
**Absorber el líquido adherido a los dientes**



**Insertar el Peine y agitar en la fila B. Incubar**



**Reacción de color en la fila F**



**Resultados**

**Después de mezclar/agitar e incubar en filas C, D y E...**

## Resumen del Procedimiento de la Prueba

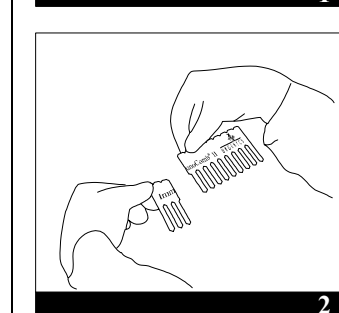
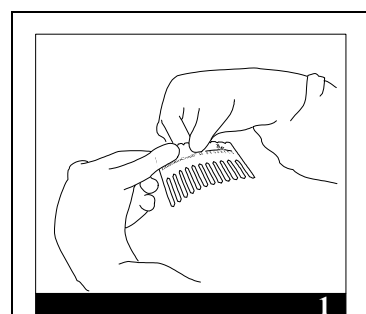
Las instrucciones abreviadas a continuación son para personas experimentadas en el uso del kit **ImmunoComb® II HCV**.

**(Para instrucciones detalladas favor de referirse al texto completo)**

1. Ponga todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente y realice la prueba a temperatura ambiente.
2. Vierta 50 µl de cada muestra y control en pocillos separados de la fila A de la Bandeja de Desarrollo y mezcle.
3. Inserte el Peine en la fila A y continúe según se describe en la Tabla 1.
4. Durante las incubaciones en las filas A y C, sacar e insertar el peine periódicamente.

**Tabla 1. Resumen del Procedimiento de la Prueba**

Etapa	Fila	Proceda como se indica
Reacción antígeno-anticuerpo	A	Mezcle; incube <b>10 minutos</b> ; absorba.
Lavado	B	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Unión del conjugado	C	Mezcle; incube <b>10 minutos</b> ; absorba.
Lavado	D	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Lavado	E	Agite; incube 2 minutos; absorba.
Reacción de color	F	Mezcle; incube <b>10 minutos</b> .
Detención de la reacción	E	Incube 1 minuto; seque al aire.



**Manera de romper el Peine**