

bioelisa CHAGAS3000-1236
3000-123796 tests
480 tests**Test d'ELISA pour la détection d'anticorps contre le *Trypanosoma cruzi* dans du sérum ou du plasma humain.****Sommaire**

La maladie de Chagas est une maladie chronique parasitaire causée par un protozoaire flagellaire, le *Trypanosoma cruzi*. Le parasite est transmis aux humains et à d'autres mammifères par un insecte vecteur, de la famille des Reduviidae. La transmission du *T. cruzi* peut aussi être congénitale ou se faire par transfusion de sang contaminé ou transplant d'organes. Le cycle de vie du parasite est long et complexe, passant par différentes phases de développement chez l'insecte vecteur et chez l'hôte vertébré. Trois étapes de la maladie sont identifiées: une courte étape aiguë et une étape chronique de longue durée, séparées par une longue phase asymptomatique, appelée phase indéterminée. Au cours des première et troisième étapes, différents organes peuvent être touchés, donnant lieu à des conséquences fatales. On estime que jusqu'à 30% des personnes infectées se trouvant dans la phase indéterminée de la maladie souffriront de troubles cardiaques, digestifs ou neurologiques dans les 10 ou 20 années suivantes. Les anticorps apparaissent peu de temps après l'infection et atteignent de très hauts niveaux, pouvant persister avec l'infection pendant de nombreuses années. **bioelisa CHAGAS** permet une détection spécifique et de haute sensibilité des anticorps anti-*T. cruzi* au cours des phases aiguë et chronique de la maladie par l'utilisation de la technique d'ELISA, grâce à l'usage d'anticorps recombinants. Il s'agit d'une méthode économique pouvant être entièrement automatisée pour le screening d'un grand nombre d'échantillons de sérum, dans des banques de sang et des laboratoires cliniques.

Principe

bioelisa CHAGAS est une méthode immunoenzymatique dans laquelle les puits d'une plaque de microtitrage ont été recouverts d'antigènes recombinants représentant 4 épitopes immunodominants de *T. cruzi*, préparés avec l'autorisation de Corixa Corporation (Breveté aux EU). Les échantillons de sérums ou plasmas à analyser sont ensuite ajoutés à ces puits. Si des anticorps spécifiques contre le *T. cruzi* sont présents dans un échantillon, un complexe stable se formera avec l'antigène qui recouvre le puits. Après un lavage pour éliminer tout le matériel non uni, des anticorps de lapin anti-IgG et anti-IgM humains marqués de peroxydase sont ajoutés et si le complexe antigène/anticorps est présent, le conjugué viendra s'unir au complexe. Après un second lavage, le substrat enzymatique et le chromogène sont ajoutés. Cette solution deviendra bleue si l'échantillon est positif. La couleur bleue virera au jaune après l'arrêt de la réaction avec l'acide sulfurique. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-*T. cruzi*. Les puits contenant des échantillons négatifs ne se teinteront d'aucune couleur.

Composants

1. **MCPL** MICROPLAQUE:
12 x 8 puits recouverts d'antigènes de *T. cruzi*.
2. **CONJ51x** CONJUGUÉ CONCENTRÉ:
Anticorps de lapin anti-IgG et anti-IgM humains conjugués à la peroxydase. Contient du colorant rouge, du mertiolate de sodium à 0,02% et des protéines stabilisatrices. À diluer 1/51 avec du diluant du conjugué avant utilisation.
3. **DIL CONJ** DILUANT DU CONJUGUÉ:
Tampon Tris contenant du colorant jaune, des additifs et du mertiolate de sodium à 0,02%. Pour diluer le conjugué concentré.
4. **DIL SAMP** DILUANT DES ÉCHANTILLONS:
Tampon Tris avec des protéines stabilisatrices, de l'azide de sodium < 0,1%, Triton X-100 < 1,0% comme conservateur et éthylène glycol 8%. Prêt à l'emploi.
5. **WASH SOLN 10x** SOLUTION DE LAVAGE CONCENTRÉE:
Tampon de phosphate concentré (10x) contenant du Tween 20 à 1% et du mertiolate de sodium à 0,01%. À diluer 1/10 dans de l'eau distillée ou désionisée avant utilisation.
6. **SUBS BUF** TAMPON SUBSTRAT:
Tampon de citrate-acétate contenant du peroxyde d'hydrogène.
7. **SOLN TMB** CHROMOGÈNE:
3,3', 5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB) dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

8. **CONTROL+** CONTRÔLE POSITIF:
Serum humain inactivé et dilué contenant des anticorps contre le *T. cruzi*. Contient du colorant vert et < 0,1% d'azide de sodium comme conservateur. Prêt à l'usage.
9. **CONTROL-** CONTRÔLE NÉGATIF:
Serum humain dilué négatif pour anti-*T. cruzi*. Contient du colorant jaune et < 0,1% d'azide de sodium comme conservateur. Prêt à l'usage.
10. **H₂SO₄1N** SOLUTION D'ARRÊT (seulement dans le coffret de 1 plaque):
Acide sulfurique 1N. Prêt à l'usage.
11. **SEALS** LAMELLES ADHÉSIVES:
Pour couvrir la microplaque pendant les incubations.
12. **BAG** SAC EN PLASTIQUE:
Pour conserver les barrettes non-utilisées.

Précautions

bioelisa CHAGAS est destiné à un usage diagnostique IN VITRO.

Utilisation réservée aux professionnels.

Le **Diluant des Échantillons** contient < 0,1% de l'azide de sodium et < 1,0% de Triton X-100. Ci-après, figurent les phrases de risque (R) et de sécurité (S) correspondantes:

- | | |
|-----|---|
| R22 | Nocif en cas d'ingestion. |
| S46 | En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette. |

ATTENTION: MATÉRIEL À RISQUE BIOLOGIQUE.

Le contrôle positif a été inactivé à chaud. Tout le matériel d'origine humaine utilisé dans le cadre de la préparation de ce produit a donné des résultats négatifs quant à la présence d'anticorps des virus HIV-1/HIV-2 et HCV, de même qu'à celle de l'antigène de surface de l'hépatite B, en utilisant une méthode commerciale autorisée. Compte tenu du fait qu'aucune méthode n'est capable d'offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, ce produit doit être manipulé avec précaution:

- Veiller à ce que les réactifs n'entrent jamais en contact avec la peau ou les yeux; si cela était le cas, laver abondamment avec de l'eau.
- Porter des gants.
- Ne pipeter aucun réactif avec la bouche.
- Ne pas fumer.
- Déposer tout le matériel utilisé dans des récipients conçus pour le matériel bio-contaminant. Les restes d'échantillons, de contrôles, de réactifs aspirés et de cônes jetables doivent être recueillis dans un récipient destiné à cet effet et autoclavés pendant une heure à 121°C ou traités dans de l'hypochlorite de sodium à une concentration finale de 10% pendant 30 minutes. (Les restes contenant de l'acide doivent être neutralisés avant d'ajouter l'hypochlorite de sodium).
- Certains réactifs de ce coffret contiennent de l'azide sodique comme conservateur. L'azide sodique peut réagir au contact de tuyauteries et de bouches d'écoulement des eaux en plomb ou en cuivre. Cette réaction donne lieu à des azides métalliques hautement explosives. Lorsque vous jetez les restes de réactifs, veuillez laisser couler l'eau abondamment.

Précautions de manipulation:

- Adapter le laveur au type de plaque utilisé (fond plat) pour effectuer un bon lavage.
- Ne pas mélanger les réactifs provenant de lots différents.
- Ne pas utiliser de réactifs après expiration de leur date limite d'utilisation.
- Ne pas utiliser le réactif si on observe un changement dans l'apparence de l'un des composants de ce kit.
- De plus grandes précautions doivent être prises pour éviter des contaminations microbiennes et une contamination croisée entre les réactifs.
- Utiliser une pointe jetable neuve pour pipeter chaque échantillon ou réactif.
- Il est très important de préparer la solution substrat-TMB juste 5-10 minutes avant l'emploi. La conserver dans un récipient bien fermé et à l'abri de la lumière.
- Des restes de savons et/ou d'agents oxydants dans les récipients utilisés pour la préparation de la solution substrat-TMB peuvent interférer dans la réaction. Il convient donc de laver les récipients à utiliser avec de l'acide sulfurique ou chlorhydrique 1N et de bien les rincer avec de l'eau distillée. Utiliser de préférence du matériel en plastique jetable.

Conservation et stabilité

Les composants resteront stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, à condition d'être conservés à 2-8°C. Le sachet contenant la microplaque doit être laissé à température ambiante avant d'être ouvert pour éviter toute condensation dans les puits. Après ouverture du sachet, la microplaque reste stable pendant 3 mois lorsqu'elle est conservée dans le sac en plastique bien fermé avec le petit sachet cartouche et à une température d'entre 2 et 8°C. Une fois diluée, la solution de lavage reste stable pendant 2 semaines si celle-ci est conservée à une température d'entre 2 et 8°C. Une fois diluée, le conjugué doit être utilisé dans le même jour. Garder le chromogène à l'abri de la lumière. Une fois préparée, la solution substrat-TMB n'est pas stable, c'est pourquoi les indications données pour son utilisation doivent être strictement suivies.

Présentations disponibles

- Coffret de 1 plaque (96 tests), **REF** 3000-1236.
Contient: 1 plaque, 1 x 0,35 ml conjugué concentré, 1 x 15 ml diluant du conjugué, 1 x 30 ml diluant des échantillons, 2 x 50 ml solution de lavage concentrée, 1 x 14 ml tampon substrat, 1 x 1,5 ml chromogène, 1 x 2 ml contrôle positif, 1 x 3 ml contrôle négatif, 1 x 12 ml solution d'arrêt, 1 sac en plastique et des lamelles adhésives.
- Coffret de 5 plaques (5 x 96 tests), **REF** 3000-1237.
Contient: 5 plaques, 1 x 1,3 ml conjugué concentré, 1 x 70 ml diluant du conjugué, 1 x 120 ml diluant des échantillons, 3 x 100 ml solution de lavage concentrée, 5 x 14 ml tampon substrat, 1 x 1,5 ml chromogène, 1 x 5 ml contrôle positif, 1 x 7 ml contrôle négatif, 1 sac en plastique et des lamelles adhésives.

Matériel nécessaire non fourni

- Eau distillée ou désionisée.
- Pipettes multicanal et micropipettes (10 µl, 100 µl, 200 µl) et cônes jetables.
- Incubateur à 37°C ± 1°C.
- Chronomètre.
- Lecteur de microplaques avec filtre de 450 nm. Recommandable filtre de référence de 620 ou 630 nm.
- Système de lavage manuel ou automatique.
- Solution d'arrêt (coffret de 5 plaques): acide sulfurique 1N. On peut également employer de l'acide sulfurique 2N ou 4N.

Prélèvement de l'échantillon

Utiliser du sérum frais ou du plasma (EDTA). D'autres anticoagulants doivent être évalués avant leur utilisation. Les échantillons peuvent être conservés pendant 3 jours à une température d'entre 2 et 8°C. Pour une plus longue conservation, ceux-ci doivent être congelés (-20°C). Éviter les cycles répétés de congélation/décongélation des échantillons. Des particules en suspension doivent être éliminées par centrifugation. Les sérums ou plasmas ne doivent pas être inactivés à chaud; en effet, cela pourrait donner lieu à de mauvais résultats.

Traitement automatique

Ce test peut être utilisé de manière automatique ou semi-automatique avec divers instruments. Il est très important de valider un système automatique pour démontrer que les résultats obtenus sur les échantillons sont équivalents aux résultats d'un test manuel. Il est recommandé à l'utilisateur de valider l'instrument régulièrement. Si vous rencontrez des difficultés dans la programmation et le réglage des processeurs automatiques de Biokit, veuillez contacter votre distributeur.

PROCÉDURE (Voir schéma de la procédure)

Opérations préalables

Tous les réactifs doivent revenir à température ambiante (20-25°C) avant le début du test.

Les réactifs liquides doivent être homogénéisés doucement avant l'emploi.

Diluer la solution de lavage concentrée 1/10 dans de l'eau distillée ou désionisée. Pour une plaque, mélanger 50 ml de solution de lavage concentrée à 450 ml d'eau. En cas de non-utilisation d'une plaque complète, préparer le volume proportionnel de solution.

Diluer le conjugué concentré 1/51 avec du diluant du mélange suivant les indications du tableau 1. Pour le coffret d'1 plaque, si la plaque entière est utilisée, ajouter 300 µl du mélange conjugué concentré directement dans le flacon contenant 15 ml de diluant du conjugué. **Mélanger doucement.**

TABLEAU 1

Barrettes requises	1	2	4	6	8	10	12
Diluant du conjugué ml	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Conjugué concentré µl	20	40	80	120	160	200	240

Réalisation du test

1. N'utiliser que le nombre de barrettes nécessaire pour le test. Réserver 6 puits pour le blanc et les contrôles. Doser 200 µl de diluant des échantillons pour le reste des puits. Ensuite, doser 10 µl de chaque échantillon dans les puits préalablement désignés.
2. Doser 200 µl de contrôle négatif dans 3 puits et 200 µl de contrôle positif dans 2 puits. **NE PAS DILUER LES CONTRÔLES. ILS SONT DÉJÀ PRÊTS À L'EMPLOI.** Laisser un puits vide pour le blanc de substrat.
3. Couvrir la plaque avec une lamelle adhésive, **l'agiter doucement** et laisser incubé pendant 1 heure à 37°C.
4. Jeter la lamelle adhésive. Aspirer le contenu des puits et les remplir entièrement (environ 350 µl) de solution de lavage diluée. Répéter 3 fois plus le processus d'aspiration-lavage. S'assurer que chaque colonne de puits soit mise à tremper pendant au moins 15 secondes avant le nouveau cycle d'aspiration. Après le dernier lavage, taper la plaque inversée sur un papier buvard pour éliminer tout excès de liquide dans les puits.
5. Transférer 100 µl de conjugué dilué dans tous les puits de la plaque, à l'exception du puits destiné au blanc de substrat.
6. Couvrir la plaque d'une lamelle adhésive et laisser incubé pendant 30 minutes à 37°C.
7. Pendant les 5-10 dernières minutes de cette incubation, préparer la solution substrat-chromogène. Pour une plaque, ajouter 280 µl de la solution de chromogène (TMB) dans un flacon de tampon substrat (14 ml) et **bien mélanger**. Si toute la plaque n'est pas utilisée, préparer la quantité nécessaire d'après les indications du tableau 2. La solution finale doit être incolore. Si celle-ci vire au bleu, ne pas l'utiliser.

TABLEAU 2

Barrettes requises	1	2	4	6	8	10	12
Tampon substrat ml	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Chromogène (TMB) µl	20	40	80	120	160	200	240

NOTE: Le TMB est dissout dans du DMSO. Compte tenu du fait que la température de fusion du DMSO est de 18°C, le chromogène doit atteindre une température de 20-25°C. **Bien agiter** avant l'emploi. Le fait que le chromogène présente une couleur jaunâtre est normal.

8. Jeter la lamelle adhésive. Aspirer et laver la plaque tel qu'indiqué au point 4.
9. Ajouter 100 µl de substrat-TMB à tous les puits.
10. Laisser incubé sans couvrir pendant 30 minutes à température ambiante (20-25°C).
11. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt à chaque puits en suivant la même séquence et aux mêmes intervalles que pour l'ajout du substrat-TMB.
12. Mettre le lecteur à zéro avec le puits du blanc à 450 nm et lire l'absorbance de chacun des puits dans le délai maximum de 30 minutes. Il est recommandé de procéder à la lecture bi-chromatique en utilisant un filtre de référence 620 - 630 nm.

Contrôle de qualité

Les résultats d'un essai ne sont valables que dans le respect des critères suivants:

1. Blanc de substrat.
La valeur d'absorbance doit être inférieure ou égale à 0,100.
2. Moyenne du contrôle négatif (CNx).
L'absorbance de chaque contrôle négatif doit être inférieure ou égale à 0,200 après avoir ôté le blanc. Si l'une de ces valeurs n'entre pas dans cette marge, la moyenne doit être rejetée et recalculée. Si les valeurs hors-marge sont au nombre de deux, le test devra être refait.

Exemple:

Contrôle négatif	Absorbance
1	0,045
2	0,043
3	0,041
Total	0,129

$$CNx = 0,129/3 = 0,043$$

Dans cet exemple, aucune des valeurs ne doit être écartée.

3. Moyenne du contrôle positif (CPx).

La moyenne de l'absorbance des contrôles positifs doit être égale ou supérieure à 0,600 après avoir ôté le blanc. Si la moyenne est inférieure à cette valeur, l'analyse devra être refaite.

Exemple:

Contrôle positif	Absorbance
1	1,536
2	1,551
Total	3,087

$$CPx = 3,087/2 = 1,544$$

Résultats

- Calculer la valeur seuil en ajoutant 0,300 à la moyenne du contrôle négatif.

$$\text{Valeur seuil} = CNx + 0,300$$

Exemple: $CNx = 0,043$ $Valeur\ seuil = 0,043 + 0,300 = 0,343$

- Diviser l'absorbance de l'échantillon par la valeur seuil.

Positif: rapport absorbance/valeur seuil $\geq 1,0$
 Négatif: rapport absorbance/valeur seuil $< 0,9$
 Douteux: rapport absorbance/valeur seuil $\geq 0,9 < 1,0$

Interprétation des résultats

Un résultat positif indique une infection par le *T. cruzi*. L'histoire clinique du patient doit être prise en compte.

Limites de la procédure

Tout échantillon ayant donné un résultat positif ou douteux doit à nouveau être analysé, deux fois. Si le résultat est à nouveau positif ou douteux, l'échantillon devrait alors être analysé avec un autre test.

Pour le bon fonctionnement du coffret, les instructions données doivent scrupuleusement être suivies. Tout écart peut donner lieu à l'obtention de résultats aberrants.

Comme dans tous les immunotests très sensibles, il existe la possibilité de résultats positifs qui ne se répètent pas.

Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une exposition ou d'une infection par le *T. cruzi*.

Caractéristiques fonctionnelles

Évaluations

Le fonctionnement du coffret **bioelisa CHAGAS** a été évalué dans différentes études comparatives avec d'autres tests commerciaux, en analysant des échantillons de donneurs de sang et des échantillons préalablement classés négatifs ou positifs d'anticorps contre le *T. cruzi*.

- Dans une évaluation réalisée dans une banque de sang, 3024 échantillons de donneurs ont été testés en parallèle avec les méthodes utilisées dans la routine pour le criblage d'anticorps contre la maladie de Chagas (EIA, HA et IFA). Parmi ces échantillons, 21 ont été réactifs au **bioelisa CHAGAS** et la positivité de sept (7) d'entre eux a été confirmée. La sensibilité obtenue a donc été de 100% et la spécificité de 99,5%, si on considère tous les échantillons initialement réactifs.

- Dans une autre évaluation réalisée dans une banque de sang, 2723 échantillons ont été analysés en parallèle avec les méthodes utilisées dans la routine pour le criblage d'anticorps contre la maladie de Chagas (EIA, HA et IFA). Sur le total des échantillons testés, 72 ont réagi au **bioelisa CHAGAS** et la véritable positivité de deux (2) d'entre eux a été confirmée. La sensibilité obtenue a donc été de 100% et la spécificité dans le criblage, de 97,4%.
- Dans une étude réalisée dans une troisième banque de sang, 2655 échantillons ont été analysés en parallèle avec les méthodes utilisées dans la routine pour le criblage d'anticorps contre la maladie de Chagas (EIA, HA et IFA). Parmi ces échantillons, 57 ont réagi au **bioelisa CHAGAS** et la positivité de dix (10) d'entre eux a été confirmée. Dans cette évaluation, la sensibilité obtenue a été de 100% et la spécificité dans le criblage, de 98,2%.
- Un panneau de 498 échantillons préalablement classés positifs (18) ou négatifs (480) a été analysé. La sensibilité obtenue a été de 100% et la spécificité, de 98,3%.
- Un panneau de 115 échantillons préalablement classés véritablement positifs a été analysé. Les résultats de tous les échantillons ont été positifs, avec l'obtention d'une sensibilité de 100%.
- 796 échantillons classés négatifs ont été analysés; parmi ces derniers, 4 ont présenté un résultat positif avec le **bioelisa CHAGAS**. Dans cette étude, la spécificité obtenue a été de 99,5%.

Précision

Reproductibilité intra-plaque:

Les coefficients de variation obtenus pour les absorbances de 24 répliques d'un échantillon positif ont été de 2,5%, 4,2% et 3,1% dans trois lots étudiés.

Reproductibilité inter-test:

Trois échantillons positifs de différents niveaux ont été testés dans trois tests différents. Les coefficients de variation obtenus pour les ratios absorbance / valeur seuil des 3 échantillons ont été de 4,6%, 3,5% et 8,7%.

bioelisa: Guide de problèmes

Problème	Causes éventuelles	Solution
1. Contrôles hors validation.	1a. Température, incubation ou pipetage incorrect.	<i>Vérifier la procédure. Refaire le test.</i>
	1b. Préparation incorrecte des réactifs, erreur dans les dilutions. Réactifs non mélangés correctement.	<i>Vérifier la procédure. Refaire le test.</i>
	1c. Contamination croisée entre contrôles.	<i>Pipeter soigneusement. Ne pas échanger les bouchons des flacons. Refaire le test.</i>
	1d. Filtre de lecture incorrect.	<i>S'assurer que le filtre de lecture soit bien de 450 nm. Si le filtre de référence de 620-630 nm n'est pas utilisé, les absorbances augmentent d'environ 50 milliunités.</i>
	1e. Interférence sur le chemin optique.	<i>Vérifier le lecteur. Nettoyer ou sécher le fond des puits. S'assurer de l'absence de bulles d'air. Répéter la lecture.</i>
	1f. Des composants de lots différents ont été utilisés.	<i>Ne pas utiliser de lots différents dans la mesure où ils sont faits pour chaque lot en particulier.</i>
	1g. Réactifs périmés.	<i>Vérifier la date d'expiration du coffret et de ses composants. Ne pas utiliser de coffret périmé.</i>
2. Incolore ou faible couleur à la fin du test.	2a. Un ou plusieurs réactifs n'ont pas été ajoutés ou l'ont été dans une séquence erronée.	<i>Vérifier la procédure. Refaire le test.</i>
	2b. Conjugué inactif: mauvaise conservation.	<i>Vérifier s'il n'y a pas eu contamination; vérifier la procédure. Refaire le test.</i>
	2c. Microplaque inactive: mauvaise conservation.	<i>Toujours conserver les barrettes non usagées dans un sac mini grip bien fermé, avec le desséchant à l'intérieur. Refaire le test.</i>
	2d. Substrat inactive: conservation ou dilution incorrecte. Contamination croisée avec la solution d'arrêt.	<i>Toujours utiliser une dilution fraîche de TMB dans le tampon substrat. Vérifier la procédure. Refaire le test.</i>

bioelisa: Guide de problèmes

Problème	Causes éventuelles	Solution
3. Trop de couleur dans tous les puits de la microplaque.	3a. Substrat contaminé, oxydé ou mal préparé.	<i>S'assurer que le substrat préparé soit incolore. S'il est bleu, l'écarter. S'assurer que le TMB soit entièrement liquide avant de l'utiliser. S'assurer que le TMB soit bien mélangé avec le tampon substrat. Utiliser des flacons ou des conteneurs jetables ou lavés avec de la solution acide. Refaire le test.</i>
	3b. Réactifs contaminés ou mal préparés.	<i>Vérifier contamination (aspect trouble). Vérifier dilutions. Refaire le test.</i>
	3c. Solution de lavage (1x) contaminée.	<i>Vérifier la qualité de l'eau distillée / désionisée utilisée pour la préparation de la dilution. Refaire le test.</i>
	3d. Lavage insuffisant ou non consistant: remplissage ou aspiration insuffisant ou non uniforme, nombre de cycles de lavage insuffisant. Lavoir contaminé.	<i>Vérifier le lavoir. Remplir les puits jusqu'en haut et aspirer complètement. Augmenter le nombre de cycles de lavage. Taper la plaque inversée contre le papier buvard. Refaire le test.</i>
	3e. Une solution de lavage d'un autre fabricant a été utilisée.	<i>Utiliser la solution de lavage du biokit.</i>
	3f. Mauvaise dilution des échantillons.	<i>Vérifier la procédure. Refaire le test.</i>
4. Reproductibilité pauvre ou élevée nombre d'échantillons réactifs qui ne se répètent pas.	4a. Problèmes de lavage.	<i>Voir rubriques 3c, 3d, 3e.</i>
	4b. Pipettes mal calibrées ou cônes mal encastrés. Technique de pipetage incorrect.	<i>Utiliser des pipettes calibrées avec des cônes bien ajustés. Pipeter soigneusement sans faire de bulles et sans éclaboussures. Refaire le test.</i>
	4c. Réactifs trop froids ou non correctement mélangés avant l'usage.	<i>Tempérer réactifs et bien les agiter avant usage.</i>
	4d. Courants d'air sur la microplaque pendant les incubations.	<i>Mettre la microplaque à l'abri des courants d'air.</i>
	4e. Trop de temps dans l'addition des échantillons et ou des réactifs. Inconsistance dans les intervalles de temps, bulles d'air.	<i>Développer une technique uniforme et reproductible.</i>
	4f. Interférence sur le chemin optique.	<i>Voir 1e.</i>