

bioelisa CHAGAS3000-1236
3000-123796 tests
480 tests**Test ELISA per il rilevamento di anticorpi contro il *Trypanosoma cruzi* nel siero o plasma umano.****Sommario**

La malattia di Chagas è una malattia cronica parassitaria causata da un protozoo flagellato, il *Trypanosoma cruzi*. Il parassita viene trasmesso all'uomo e ad altri mammiferi da un insetto vettore della famiglia Reduviidae. La trasmissione del *T. cruzi* può anche essere congenita oppure avvenire per trasfusione di sangue infetto o con il trapianto di organi. Il ciclo vitale del parassita è lungo e complesso, con varie fasi di sviluppo nell'insetto vettore e nell'ospite vertebrato. Vi sono tre stadi della malattia: una fase acuta breve e una fase cronica di lunga durata, separate da una lunga fase asintomatica detta fase indeterminata. Nella prima e nella terza fase possono essere colpiti diversi organi e le conseguenze possono essere fatali. Si calcola che fino al 30% delle persone che presentano la fase indeterminata dell'infezione riporteranno danni cardiaci, digestivi o neurologici dopo 10 - 20 anni. Gli anticorpi compaiono poco dopo l'infezione, aumentano fino a raggiungere livelli elevati e possono convivere con l'infezione per molti anni. **bioelisa CHAGAS** permette un rilevamento specifico e altamente sensibile degli anticorpi anti-*T. cruzi* nelle fasi acuta e cronica della malattia per mezzo della tecnica ELISA, grazie all'uso di antigeni ricombinanti. È un metodo economico che può essere completamente automatizzato per lo screening di un gran numero di campioni di siero nelle banche del sangue e nei laboratori clinici.

Principio

bioelisa CHAGAS è un metodo immunoenzimatico nel quale i pozzetti sono stati ricoperti di una micropiastra con antigeni ricombinanti che rappresentano 4 epitopi immunodominanti di *T. cruzi*, prodotti su licenza della Corixa Corporation (brevetto USA). A questi pozzetti si aggiungono i campioni di siero o di plasma da analizzare. Se in un campione sono presenti anticorpi specifici del *T. cruzi*, si formerà un complesso stabile con l'antigene che ricopre il pozzetto. Dopo aver eseguito un lavaggio per estrarre tutto il materiale non aggregato si aggiungono IgG di coniglio anti-IgG e anti-IgM umane marcate con perossidasi e, se il complesso antigene/anticorpo è presente, il coniugato si unirà al complesso. Dopo un secondo lavaggio si aggiungono il sostrato enzimatico e il cromogeno. Questa soluzione prenderà un colore azzurro se il campione è positivo. L'azzurro diventa giallo dopo aver fermato la reazione con acido solforico. L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione di anticorpi anti-*T. cruzi*. I pozzetti contenenti campioni negativi restano incolori.

Componenti

- MCPL** MICROPIASTRA:
12 x 8 pozzetti ricoperti di antigeni di *T. cruzi*.
- CONJ 51x** CONIUGATO CONCENTRATO:
Anticorpi di coniglio anti-IgG e anti-IgM umani coniugati con perossidasi. Contiene colorante rosso, sodio mertiolato allo 0,02% e proteine stabilizzatrici. Da diluire 1/51 con il diluente del coniugato prima dell'uso.
- DIL CONJ** DILUENTE DEL CONIUGATO:
Tampone Tris contenente colorante giallo, additivi e sodio mertiolato allo 0,02%. Per diluire il coniugato concentrato.
- DIL SAMP** DILUENTE DEI CAMPIONI:
Tampone Tris con proteine stabilizzatrici, < 0,1% di sodio azide, < 1,0% di Triton X-100 come conservante e 8% Etilenglicole. Pronto all'uso.
- WASH SOLN 10x** SOLUZIONE DI LAVAGGIO CONCENTRATA:
Tampone fosfato concentrato (10x) contenente Tween 20 all'1% e sodio mertiolato allo 0,01%. Da diluire 1/10 con acqua distillata o deionizzata prima dell'uso.
- SUBS BUF** TAMPONE SUBSTRATO:
Tampone citrato-acetato contenente perossido di idrogeno.
- SOLN TMB** CROMOGENO:
3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) diluita in dimetilsolfossido (DMSO).
- CONTROL +** CONTROLLO POSITIVO:
Siero umano inattivato e diluito contenente anticorpi contro il *T. cruzi*. Contiene colorante verde e sodio azide < 0,1% come conservante. Pronto all'uso.

9. **CONTROL-** CONTROLLO NEGATIVO:
Siero umano diluito negativo per anti-*T. cruzi*. Contiene colorante giallo e sodio azide < 0,1% come conservante. Pronto all'uso.
10. **H₂SO₄ 1N** SOLUZIONE BLOCCANTE (solo nel kit da 1 piastra):
Acido solforico 1N. Pronto all'uso.
11. **SEALS** FOGLI ADESIVI:
Per coprire la micropiastra durante le incubazioni.
12. **BAG** SACCHETTO DI PLASTICA:
Per conservare le strisce non adoperate.

Precauzioni

bioelisa CHAGAS è per uso diagnostico IN VITRO.
Solo per uso professionale.

Il **Diluente dei Campioni** contiene < 0,1% di sodio azide e < 1,0% di Triton X-100. Qui di seguito sono riportate le corrispondenti frasi di rischio (R) e di sicurezza (S):

- | | |
|-----|---|
| R22 | Nocivo per ingestione. |
| S46 | In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. |

ATTENZIONE: MATERIALE POTENZIALMENTE BIOPERICOLOSO.

Il controllo positivo è stato inattivato a caldo. Tutto il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione di questo prodotto è risultato negativo per anticorpi dei virus HIV-1/HIV-2 e HCV, come pure a quella dell'antigene di superficie dell'epatite B, secondo analisi eseguite con un metodo commerciale autorizzato. Poiché nessun metodo può offrire la totale sicurezza dell'assenza di agenti infettivi, questo prodotto deve essere manipolato con precauzione:

- Evitare che i reagenti entrino a contatto con la pelle o con gli occhi; se ciò dovesse accadere, lavare con acqua abbondante.
- Usare guanti.
- Non pipettare mai i reagenti con la bocca.
- Non fumare.
- Depositare tutti i materiali utilizzati in recipienti idonei per materiale biocontaminante. I resti di campioni, controlli, tamponi e reagenti aspirati devono essere raccolti in un recipiente apposito e sterilizzati in autoclave per un'ora a 121°C, oppure trattati con ipoclorito di sodio a una concentrazione finale del 10% per 30 minuti. (I resti contenenti acido devono essere neutralizzati prima di aggiungere l'ipoclorito sodico).
- Alcuni reagenti del kit contengono sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire a contatto con tubature e scarichi in piombo o in rame, formando azidi metalliche altamente esplosive. Far scorrere acqua in abbondanza quando si gettano i residui di reagenti.

Precauzioni durante l'uso:

- Adattare il lavatore al tipo di piastra utilizzata (fondo piatto) per realizzare un buon lavaggio.
- Non mescolare reagenti provenienti da lotti diversi.
- Non usare reagenti scaduti.
- Non utilizzare il reagente se si osserva qualche cambio di aspetto di un qualsiasi componente del kit.
- Prendere le precauzioni necessarie per evitare la contaminazione microbica e la contaminazione incrociata tra i reagenti.
- Utilizzare un nuovo puntale monouso per pipettare ogni singolo campione o reagente.
- È molto importante preparare la soluzione di substrato-TMB soltanto 5-10 minuti prima dell'uso. Mantenerla in un recipiente ben chiuso e al riparo dalla luce.
- Eventuali resti di saponi e/o agenti ossidanti nei recipienti utilizzati per la preparazione della soluzione substrato-TMB possono interferire nella reazione. È perciò conveniente lavare i recipienti da utilizzare con acido solforico o cloridrico 1N e risciacquarli accuratamente con acqua distillata. Usare preferibilmente materiale plastico monouso.

Conservazione e stabilità

I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, se conservati a 2-8°C. Il sacchetto che contiene la micropiastra deve essere portato a temperatura ambiente prima dell'apertura per evitare la formazione di condensa nei pozzetti. Dopo l'apertura del sacchetto, la micropiastra rimane stabile per 3 mesi se conservata a 2-8°C nel sacchetto ben chiuso, con la bustina di gel di silice dentro. La soluzione di lavaggio, una volta diluita, è stabile per due settimane se conservata a 2-8°C. Una volta diluito, il coniugato deve essere usato nello stesso giorno. Conservare il cromogeno al riparo dalla luce. Una volta preparata, la soluzione substrato-TMB non rimane stabile, quindi è necessario seguire scrupolosamente le istruzioni per l'uso.

Confezioni disponibili

- Kit da 1 piastra (96 test), **REF** 3000-1236.
Contiene: 1 piastra, 1 x 0,35 ml coniugato concentrato, 1 x 15 ml diluente del coniugato, 1 x 30 ml diluente dei campioni, 2 x 50 ml soluzione di lavaggio concentrata, 1 x 14 ml tampone substrato, 1 x 1,5 ml cromogeno, 1 x 2 ml controllo positivo, 1 x 3 ml controllo negativo, 1 x 12 ml soluzione bloccante, 1 sacchetto di plastica e fogli adesivi.
- Kit da 5 piastre (5 x 96 test), **REF** 3000-1237.
Contiene: 5 piastre, 1 x 1,3 ml coniugato concentrato, 1 x 70 ml diluente del coniugato, 1 x 120 ml diluente dei campioni, 3 x 100 ml soluzione di lavaggio concentrata, 5 x 14 ml tampone substrato, 1 x 1,5 ml cromogeno, 1 x 5 ml controllo positivo, 1 x 7 ml controllo negativo, 1 sacchetto di plastica e fogli adesivi.

Materiale necessario non incluso

- Acqua distillata o deionizzata.
- Pipette multicanale e micropipette (10 µl, 100 µl, 200 µl) e puntali monouso.
- Stufa termostatica a 37°C ± 1°C.
- Cronometro.
- Lettore di micropiastre con filtro da 450 nm. Raccomandabile un filtro di riferimento da 620 o 630 nm.
- Sistema di lavaggio manuale o automatico.
- Soluzione bloccante (kit da 5 piastre): acido solforico 1N. Si può utilizzare anche acido solforico 2N o 4N.

Raccolta dei campioni

Usare siero fresco o plasma (EDTA). Altri anticoagulanti devono essere valutati prima dell'uso. I campioni possono essere conservati per 3 giorni a 2-8°C. Per tempi più lunghi i campioni vanno congelati (-20°C). Non procedere a ripetuti congelamenti e scongelamenti. Eventuali particelle in sospensione vanno eliminate mediante centrifugazione. Il siero o plasma non deve essere inattivato a caldo per evitare risultati erranei.

Trattamento automatico

Questo test è utilizzabile in modo automatico o semiautomatico con vari strumenti. È molto importante validare qualsiasi sistema automatico per dimostrare che i risultati ottenuti con i campioni sono equivalenti a quelli del test manuale. È raccomandabile validare periodicamente lo strumento. In caso di difficoltà nella programmazione e regolazione dei processori automatici Biokit, contattare il proprio distributore.

PROCEDURA (Vedere schema del procedimento)**Operazioni preliminari**

Tutti i reagenti devono essere a temperatura ambiente (20-25°C) prima di cominciare il test.

I reagenti liquidi devono essere omogeneizzati delicatamente prima dell'uso.

Diluire la soluzione di lavaggio concentrata 1/10 con acqua distillata o deionizzata. Per una piastra mescolare 50 ml di soluzione di lavaggio concentrata con 450 ml d'acqua. Se non si utilizza una piastra completa, preparare il volume proporzionale di soluzione.

Diluire il coniugato concentrato 1/51 con il diluente del coniugato, come indicato nella tabella 1. Per il kit da 1 piastra, se si usa la piastra intera, aggiungere 300 µl del coniugato concentrato direttamente nel flacone che contiene 15 ml di diluente del coniugato. **Mescolare delicatamente.**

TABELLA 1

Strisce occorrenti	1	2	4	6	8	10	12
Diluente del coniugato ml	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Coniugato concentrato µl	20	40	80	120	160	200	240

Esecuzione del test

1. Utilizzare solo il numero di strisce necessarie per il test. Prevedere 6 pozzetti per bianco e controlli. Dosare 200 µl di diluente dei campioni nei restanti pozzetti. Quindi, dosare 10 µl di ogni campione nei pozzetti previamente selezionati.
2. Dosare 200 µl di controllo negativo in 3 pozzetti e 200 µl di controllo positivo in 2 pozzetti. **NON DILUIRE I CONTROLLI. SONO GIÀ PRONTI ALL'USO.** Lasciare un pozzetto vuoto per il bianco del substrato.
3. Coprire la piastra con un foglio adesivo, **agitarla delicatamente** e incubare per 1 ora a 37°C.
4. Scartare il foglio adesivo. Aspirare il contenuto dei pozzetti e riempirli completamente (circa 350 µl) con soluzione di lavaggio diluita. Ripetere il processo di aspirazione e lavaggio altre 3 volte. Verificare che ogni colonna di pozzetti stia a bagno per almeno 15 secondi prima del nuovo ciclo di aspirazione. Dopo l'ultimo lavaggio battere sulla piastra, capovolta su una carta assorbente, per rimuovere dai pozzetti il liquido in eccesso.
5. Dispensare 100 µl di coniugato diluito a tutti i pozzetti della piastra, ad eccezione del pozzetto per il bianco del substrato.
6. Coprire la piastra con un foglio adesivo e incubare per 30 minuti a 37°C.
7. Durante gli ultimi 5-10 minuti di questa incubazione, preparare la soluzione di substrato-cromogeno. Per una piastra aggiungere 280 µl della soluzione di cromogeno (TMB) in un flacone di tampone substrato (14 ml) e **mescolare bene**. Se non si adopera tutta la piastra, preparare la quantità necessaria come indicato nella tabella 2. La soluzione finale deve essere incolore: scartarla se diventa azzurra.

TABELLA 2

Strisce occorrenti	1	2	4	6	8	10	12
Tampone substrato ml	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Cromogeno (TMB) µl	20	40	80	120	160	200	240

NOTA: Il TMB è diluito in DMSO. Dato che la temperatura di fusione del DMSO è di 18°C, il cromogeno deve raggiungere una temperatura di 20-25°C ed essere **agitato bene** prima dell'uso. È normale che il cromogeno presenti un colore giallastro.

8. Scartare il foglio adesivo. Aspirare e lavare la piastra come indicato al punto 4.
9. Aggiungere 100 µl di substrato-TMB in tutti i pozzetti.
10. Incubare senza coprire per 30 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).
11. Aggiungere 100 µl di soluzione bloccante in ogni pozzetto, mantenendo la stessa sequenza e con gli stessi intervalli osservati nell'aggiunta del substrato-TMB.
12. Regolare lo zero del lettore con il pozzetto del bianco a 450 nm e leggere l'assorbanza di ogni pozzetto entro 30 minuti al massimo. Si raccomanda di eseguire la lettura bicromatica utilizzando un filtro di riferimento di 620 - 630 nm.

Controllo di qualità

I risultati di una prova sono validi se vengono rispettati i seguenti criteri:

1. Bianco del substrato.
Il valore di assorbanza deve essere inferiore o uguale a 0,100.
2. Media del controllo negativo (CNx).
L'assorbanza di ogni controllo negativo deve essere minore o uguale a 0,200 una volta sottratto il bianco. Se un valore non rientra in questo margine è necessario scartarlo e ricalcolare la media. Se sono due i valori che eccedono questo margine, il test va ripetuto.

Esempio:

Controllo negativo	Assorbanza
1	0,045
2	0,043
3	0,041
Totale	0,129

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

In questo esempio non bisogna scartare alcun valore.

3. Media del controllo positivo (CPx).

La media dell'assorbanza dei controlli positivi deve essere uguale o superiore a 0,600 una volta sottratto il bianco. Se la media è inferiore a questo valore, l'analisi va ripetuta.

Esempio:

Controllo negativo	Assorbanza
1	1,536
2	1,551
Totale	3,087

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

Risultati

1. Calcolare il valore di soglia aggiungendo 0,300 alla media del controllo negativo.

Valore di soglia = CNx + 0,300

Esempio: CNx = 0,043 Valore di soglia = 0,043 + 0,300 = 0,343

2. Dividere l'assorbanza del campione per il valore di soglia.

Positivo: rapporto assorbanza/valore di soglia $\geq 1,0$

Negativo: rapporto assorbanza/valore di soglia $< 0,9$

Dubbio: rapporto assorbanza/valore di soglia $\geq 0,9 < 1,0$

Interpretazione dei risultati

Un risultato positivo indica infezione da *T. cruzi*. È necessario fare riferimento alla cartella clinica del paziente.

Limitazioni della procedura

Se un campione dà un risultato positivo o dubbio va analizzato di nuovo in duplicato. Se il risultato è ripetutamente positivo o dubbio, è meglio ripetere l'analisi con un altro metodo.

Per il corretto funzionamento del kit seguire scrupolosamente le istruzioni indicate. Ogni deviazione può dare origine ad aberrazioni dei risultati.

Come in tutti gli immunotest molto sensibili, esiste la possibilità di risultati positivi che non si ripetono.

Un risultato negativo non esclude la possibilità di esposizione a, oppure infezione da, *T. cruzi*.

Caratteristiche di funzionalità

Valutazioni

Il funzionamento del kit **bioelisa CHAGAS** è stato valutato in diversi studi mediante il confronto con altri test commerciali, per mezzo dell'analisi di campioni prelevati da donatori di sangue e di campioni previamente classificati come negativi o positivi relativamente alla presenza di anticorpi anti *T. cruzi*.

- In una valutazione realizzata presso una banca del sangue, sono stati analizzati 3024 campioni di donatori in parallelo con i metodi di routine utilizzati per lo screening di anticorpi della malattia di Chagas (EIA, HA e IFA). Di questi campioni, 21 sono risultati reattivi al **bioelisa CHAGAS**. Sette (7) sono stati confermati positivi. Pertanto, la sensibilità ottenuta è stata del 100% e la specificità del 99,5%, considerando tutti i campioni inizialmente reattivi.
- In un'altra valutazione realizzata presso una banca del sangue, sono stati analizzati 2723 campioni in parallelo con i metodi di routine utilizzati per lo screening di anticorpi della malattia di Chagas (EIA, HA e IFA). Di tutti questi campioni, 72 sono risultati reattivi al **bioelisa CHAGAS**. Due (2) sono stati confermati veri positivi. Pertanto, la sensibilità ottenuta è stata del 100% e la specificità nello screening è stata del 97,4%.

- In una terza banca del sangue, sono stati analizzati 2655 campioni in parallelo con i metodi di routine utilizzati per lo screening di anticorpi della malattia di Chagas (EIA, HA e IFA). Di questi, 57 campioni sono risultati reattivi al **bioelisa CHAGAS**. Dieci (10) sono stati confermati positivi. In questa valutazione la sensibilità ottenuta è stata del 100% e la specificità nello screening del 98,2%.
- È stato analizzato un gruppo di 498 campioni previamente classificati come positivi (18) o negativi (480). La sensibilità ottenuta è stata del 100% e la specificità del 98,3%.
- È stato analizzato un gruppo di 115 campioni previamente classificati come veri positivi. I risultati di tutti i campioni sono stati positivi, ed è stata ottenuta una sensibilità del 100%.
- Sono stati analizzati 796 campioni caratterizzati come negativi, 4 dei quali hanno dato un risultato positivo con il **bioelisa CHAGAS**. In questo studio la specificità ottenuta è stata del 99,5%.

Precisione

Riproducibilità intra-test:

I coefficienti di variazione ottenuti per i valori di assorbanza di un campione positivo testato in 24 repliche sono stati del 2,5%, 4,2% e 3,1% in tre lotti esaminati.

Riproducibilità inter-test:

Sono stati testati tre campioni positivi di livelli diversi in tre test diversi. I coefficienti di variazione ottenuti per i rapporti assorbanza / valore di soglia dei 3 campioni sono stati del 4,6%, 3,5% e 8,7%.

bioelisa: Guida alla soluzione dei problemi

Problema	Possibili cause	Soluzione
1. Controlli non convalidanti.	1a. Temperatura, incubazione o pipettaggio erranei.	<i>Verificare procedimento. Ripetere il test.</i>
	1b. Preparazione erronea dei reagenti, errore nelle diluizioni. Reagenti non correttamente mescolati.	<i>Verificare procedimento. Ripetere il test.</i>
	1c. Inquinamento incrociato dei controlli.	<i>Pipettare con attenzione. Non scambiare i tappi delle fiale. Ripetere il test.</i>
	1d. Filtro di lettura erroneo.	<i>Controllare che il filtro di lettura sia di 450 nm. Se non si usa un filtro di riferimento di 620-630 nm, le assorbanze aumentano di circa 50 milliunità.</i>
	1e. Interferenza nella via ottica.	<i>Controllare il lettore. Pulire o asciugare il fondo dei pozzetti. Verificare l'assenza di bolle d'aria. Ripetere la lettura.</i>
	1f. Sono stati usati componenti di lotti diversi.	<i>Non utilizzare componenti di lotti diversi dato che sono dosati per ogni singolo lotto.</i>
	1g. Reagenti scaduti.	<i>Controllare la scadenza del kit e dei suoi componenti. Non usare kit scaduti.</i>
2. Senza colore o con poco colore alla fine della prova.	2a. Uno o più reagenti non sono stati aggiunti, o sono stati aggiunti in una sequenza sbagliata.	<i>Controllare il procedimento. Ripetere la prova.</i>
	2b. Coniugato inattivo: cattiva conservazione.	<i>Controllare se vi è stato inquinamento, verificare il procedimento. Ripetere il test.</i>
	2c. Micropiastra inattiva: conservazione erronea.	<i>Conservare sempre le strip non utilizzate nel sacchetto minigrip, ben chiuso, con il deumidificante dentro. Ripetere il test.</i>
	2d. Substrato inattivo: errore di conservazione o di diluizione. Inquinamento incrociato con la soluzione bloccante.	<i>Utilizzare sempre una diluizione fresca di TMB e tampone substrato. Controllare il procedimento. Ripetere il test.</i>

bioelisa: Guida alla soluzione dei problemi

Problema	Possibili cause	Soluzione
3. Troppo colore in tutti i pozzetti della micropiastra.	3a. Substrato inquinato, ossidato o preparato in modo sbagliato.	<i>Controllare che il substrato preparato sia incolore, scartarlo se è azzurro. Verificare che il TMB sia completamente liquido prima di usarlo. Controllare la corretta miscelazione del TMB nel tampone substrato. Utilizzare fiale o contenitori monouso o lavati con soluzione acida. Ripetere il test.</i>
	3b. Reagenti inquinati o preparati in modo sbagliato.	<i>Controllare inquinamento (aspetto torbido). Controllare diluizioni. Ripetere il test.</i>
	3c. Soluzione di lavaggio (1x) inquinata.	<i>Controllare la qualità dell'acqua distillata/deionizzata utilizzata per preparare la diluizione. Ripetere il test.</i>
	3d. Lavaggio insufficiente o impreciso: Riempimento o aspirazione insufficiente o non uniformi, numero di cicli di lavaggio insufficiente. Washer inquinato.	<i>Controllare il washer. Riempire i pozzetti fino all'orlo e aspirare completamente. Incrementare il numero di cicli di lavaggio. Battere sulla piastra capovolta su carta assorbente. Ripetere il test.</i>
	3e. È stata adoperata una soluzione di lavaggio di marca diversa.	<i>Utilizzare solo la soluzione di lavaggio biokit.</i>
	3f. Diluizione erronea dei campioni.	<i>Verificare il procedimento. Ripetere il test.</i>
4. Riproducibilità scarsa o elevato numero di campioni reattivi che non si ripetono.	4a. Problemi di lavaggio.	<i>Vedere punti 3c, 3d, 3e.</i>
	4b. Pipette calibrate male o puntali incastrati male. Tecnica di pipettaggio erronea.	<i>Utilizzare pipette calibrate con puntali ben fissati. Pipettare accuratamente senza fare bolle né schizzi. Ripetere il test.</i>
	4c. Reagenti molto freddi o non correttamente mescolati prima dell'uso.	<i>Portare a temperatura ambiente i reagenti e mescolarli bene prima dell'uso.</i>
	4d. Correnti d'aria sulla micropiastra durante le incubazioni.	<i>Mantenere la micropiastra al riparo dalle correnti d'aria.</i>
	4e. Tempi troppo lunghi nell'aggiunta di campioni e/o reagenti. Imprecisione negli intervalli di tempo, bolle d'aria.	<i>La tecnica deve essere uniforme e precisa.</i>
	4f. Interferenza nella via ottica.	<i>Vedere 1e.</i>