

**bioelisa CHAGAS**3000-1236  
3000-123796 tests  
480 tests**Test de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en suero o plasma humano.****Sumario**

La enfermedad de Chagas es una enfermedad crónica parasitaria causada por un protozoo flagelar, el *Trypanosoma cruzi*. El parásito es transmitido a humanos o a otros mamíferos via insecto vector, de la familia Reduviidae. La transmisión del *T. cruzi* también puede ser congénita o por transfusión de sangre contaminada o trasplante de órganos. El ciclo de vida del parásito es largo y complejo, con varias etapas de desarrollo en el insecto vector y en el huésped vertebrado. Se reconocen tres etapas de la enfermedad: una etapa aguda corta y una etapa crónica de larga duración, separadas por una larga fase asintomática, llamada fase indeterminada. En la primera y tercera etapa diversos órganos pueden estar afectados y producirse un desenlace fatal. Se estima que hasta un 30% de personas con la forma indeterminada de la infección sufrirán daño cardíaco, digestivo o neurológico transcurridos entre 10 y 20 años. Los anticuerpos aparecen poco después de la infección y aumentan a niveles elevados, pudiendo persistir junto con la infección durante muchos años. **bioelisa CHAGAS** permite una detección específica y de alta sensibilidad de los anticuerpos anti-*T. cruzi* en las fases aguda y crónica de la enfermedad mediante la técnica de ELISA, gracias al uso de antígenos recombinantes. Se trata de un método económico que puede ser totalmente automatizado para el screening de un gran número de muestras de suero en bancos de sangre y laboratorios clínicos.

**Principio**

**bioelisa CHAGAS** es un método inmunoenzimático en el cual se han recubierto los pocillos de una placa de microtitulación con antígenos recombinantes que representan 4 epítomos inmunodominantes de *T. cruzi* preparados con licencia de Corixa Corporation (Patentado en USA). A dichos pocillos se les añade las muestras de sueros o plasmas a analizar. Si en una muestra están presentes anticuerpos específicos frente a *T. cruzi*, se formará un complejo estable con el antígeno que recubre el pocillo. Después de lavar para extraer todo el material no unido se añaden IgG de conejo anti-IgG y anti-IgM humanas marcadas con peroxidasa y, si el complejo antígeno/anticuerpo está presente, el conjugado se unirá con el complejo. Después de un segundo lavado, se añade el sustrato enzimático y el cromógeno. Esta solución desarrollará un color azul si la muestra es positiva. El color azul cambia a amarillo después de parar la reacción con ácido sulfúrico. La intensidad del color es proporcional a la concentración de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Los pocillos que contengan muestras negativas no desarrollarán color.

**Componentes**

- MCPL** MICROPLACA:  
12 x 8 pocillos recubiertos con antígenos recombinantes de *T. cruzi*.
- CONJ 51X** CONJUGADO CONCENTRADO:  
Anticuerpos de conejo anti-IgG y anti-IgM humanas conjugados con peroxidasa. Contiene colorante rojo, mertiolato sódico al 0,02% y proteínas estabilizadoras. A diluir 1/51 con el diluyente del conjugado antes de usarse.
- DIL CONJ** DILUYENTE DEL CONJUGADO:  
Tampón Tris que contiene colorante amarillo, aditivos y mertiolato sódico al 0,02%. Para diluir el conjugado concentrado.
- DIL SAMP** DILUYENTE DE LAS MUESTRAS:  
Tampón Tris con proteínas estabilizadoras, azida sódica < 0,1%, Triton X-100 < 1,0% como conservante y Etilenglicol 8%. Listo para usar.
- WASH SOLN 10x** SOLUCIÓN DE LAVADO CONCENTRADA:  
Tampón fosfato concentrado (10x) que contiene Tween 20 al 1% y mertiolato sódico al 0,01%. A diluir 1/10 con agua destilada o desionizada antes de utilizarse.
- SUBS BUF** TAMPÓN SUSTRATO:  
Tampón citrato-acetato que contiene peróxido de hidrógeno.
- SOLN TMB** CROMÓGENO:  
3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO).
- CONTROL +** CONTROL POSITIVO:  
Suero humano inactivado y diluido que contiene anticuerpos contra *T. cruzi*. Contiene colorante verde y azida sódica < 0,1% como conservante. Listo para usar.

9. **CONTROL-** CONTROL NEGATIVO:  
Suero humano diluido negativo para anti-*T. cruzi*. Contiene colorante amarillo y azida sódica < 0,1% como conservante. Listo para usar.
10. **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N** SOLUCIÓN DE PARADA: (sólo en el kit de 1 placa):  
Acido sulfúrico 1N. Listo para usar.
11. **SEALS** LÁMINAS ADHESIVAS:  
Para cubrir la placa durante las incubaciones.
12. **BAG** BOLSA DE PLÁSTICO:  
Para guardar las tiras sin usar.

### Precauciones

**bioelisa CHAGAS** es para el diagnóstico IN VITRO.  
Para uso exclusivo por profesionales.

El **Diluyente de muestras** contiene < 0,1% azida sódica y < 1,0% Triton X-100. A continuación figuran las correspondientes frases de riesgo (R) y seguridad (S):

- R22 Nocivo por ingestión.  
S46 En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstresele la etiqueta o el envase.

### ATENCIÓN: MATERIAL DE RIESGO BIOLÓGICO.

El control positivo ha sido inactivado por calor. Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de este producto ha sido encontrado negativo a la presencia de anticuerpos de los virus HIV-1/HIV-2 y HCV, así como a la del antígeno de superficie de la hepatitis B, utilizando un método comercial autorizado. Sin embargo, dado que ningún método puede ofrecer la total seguridad de la ausencia de agentes infecciosos, este producto debe manejarse con precaución:

- No permitir que los reactivos entren en contacto con la piel o los ojos; si esto ocurre, lavar con abundante cantidad de agua.
- Usar guantes.
- No pipetear ningún reactivo con la boca.
- No fumar.
- Depositar todos los materiales usados en recipientes adecuados para material biocontaminante. Los restos de muestras, controles, tampones y reactivos aspirados deben recogerse en un recipiente destinado al efecto y autoclavarse una hora a 121°C, o tratarse con hipoclorito sódico a una concentración final del 10%, durante 30 minutos. (Los restos que contengan ácido deben ser neutralizados antes de añadir el hipoclorito sódico).
- Algunos reactivos de este kit contienen azida sódica como conservante. La azida sódica puede reaccionar con tuberías y desagües de plomo o cobre dando lugar a azidas metálicas altamente explosivas. Al desechar los restos de reactivos, deje correr agua abundante.

### Precauciones de manejo:

- Ajustar el lavador al tipo de placa utilizado (fondo plano), para realizar un buen lavado.
- No mezclar reactivos procedentes de diferentes lotes.
- No usar los reactivos una vez hayan caducado.
- No utilice el reactivo si observa algún cambio de apariencia en cualquier componente incluido en el kit.
- Deben extremarse las precauciones para evitar contaminaciones microbianas y contaminación cruzada entre los reactivos.
- Utilizar una nueva punta desechable para pipetear cada muestra o reactivo.
- Es muy importante preparar la solución de sustrato-TMB justo 5-10 minutos antes de ser empleada. Mantenerla en un recipiente bien tapado y al abrigo de la luz.
- Restos de jabones y/o agentes oxidantes en los recipientes utilizados para la preparación de la solución sustrato-TMB, pueden interferir en la reacción. En caso de que se utilicen recipientes de vidrio, es conveniente lavarlos con ácido sulfúrico o clorhídrico 1N, enjuagarlos bien con agua destilada y secarlos antes de usarlos. Usar preferiblemente material plástico desechable.

### Conservación y estabilidad

Los componentes permanecerán inalterados hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se conservan entre 2-8°C. La bolsa que contiene la microplaca debe llevarse a temperatura ambiente antes de abrirla para evitar condensación en los pocillos. Una vez abierta la bolsa, la microplaca es estable por 3 meses guardada a 2-8°C en la bolsa de plástico bien cerrada, con la bolsita de silicagel. La solución de lavado, una vez diluida, es estable durante dos semanas si se conserva entre 2-8°C. Una vez diluido, el conjugado debe ser utilizado en el mismo día. Guardar el cromógeno al abrigo de la luz. La solución sustrato-TMB una vez preparada no es estable, por lo que se deben seguir estrictamente las indicaciones para su utilización.

### Presentaciones disponibles

- Kit de 1 placa (96 tests), **REF** 3000-1236.  
Contiene: 1 placa, 1 x 0,35 ml conjugado concentrado, 1 x 15 ml diluyente del conjugado, 1 x 30 ml diluyente de muestras, 2 x 50 ml solución de lavado concentrada, 1 x 14 ml tampón sustrato, 1 x 1,5 ml cromógeno, 1 x 2 ml control positivo, 1 x 3 ml control negativo, 1 x 12 ml solución de parada, 1 bolsa de plástico y láminas adhesivas.
- Kit de 5 placas (5 x 96 tests), **REF** 3000-1237.  
Contiene: 5 placas, 1 x 1,3 ml conjugado concentrado, 1 x 70 ml diluyente del conjugado, 1 x 120 ml diluyente de muestras, 3 x 100 ml solución de lavado concentrada, 5 x 14 ml tampón sustrato, 1 x 1,5 ml cromógeno, 1 x 5 ml control positivo, 1 x 7 ml control negativo, 1 bolsa de plástico y láminas adhesivas.

### Material necesario no incluido

- Agua destilada o desionizada.
- Pipetas multicanal y micropipetas (10 µl, 100 µl, 200 µl) y puntas desechables.
- Incubador a 37°C ± 1°C.
- Cronómetro.
- Lector de microplacas con filtro de 450 nm. Recomendable filtro de referencia de 620 ó 630 nm.
- Sistema de lavado manual o automático.
- Solución de parada (kit de 5 placas): ácido sulfúrico 1N. También puede emplearse ácido sulfúrico 2N ó 4N.

### Recolección de la muestra

Usar suero fresco o plasma (EDTA). Otros anticoagulantes deben ser comprobados antes de utilizarse. Las muestras pueden ser conservadas durante 3 días entre 2-8°C. Si es por un período de tiempo más largo las muestras deben ser congeladas (-20°C). Debe evitarse congelar y descongelar las muestras repetidamente. Partículas en suspensión deben eliminarse por centrifugación. Los sueros o plasmas no deben ser inactivados por calor, ya que puede conducir a resultados incorrectos.

### Procesamiento automático

Esta prueba permite su uso de modo automático o semiautomático en diferentes instrumentos. Es muy importante validar cualquier sistema automático para demostrar que los resultados obtenidos para las muestras son equivalentes a los obtenidos empleándose el ensayo manual. Se recomienda que el usuario valide periódicamente el instrumento. Si encuentra cualquier dificultad en la programación y ajuste de los procesadores automáticos de Biokit, por favor contacte con su distribuidor.

### PROCEDIMIENTO (Ver esquema del procedimiento)

#### Operaciones previas

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20-25°C) antes de empezar el ensayo.

Los reactivos líquidos deben homogeneizarse suavemente antes de usarlos.

Diluir la solución de lavado concentrada 1/10 con agua destilada o desionizada. Para una placa mezclar 50 ml de solución de lavado concentrada con 450 ml de agua. En caso de no utilizar una placa completa preparar el volumen proporcional de solución.

Diluir el conjugado concentrado 1/51 con el diluyente del conjugado, de acuerdo con la tabla 1. Para el kit de 1 placa, si se utiliza la placa entera, añadir 300 µl del conjugado concentrado directamente al vial que contiene 15 ml de diluyente del conjugado. **Mezclar suavemente.**

TABLA 1

|                            |     |     |     |     |     |      |      |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| Tiras requeridas           | 1   | 2   | 4   | 6   | 8   | 10   | 12   |
| Diluyente del conjugado ml | 1,0 | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 | 12,0 |
| Conjugado concentrado µl   | 20  | 40  | 80  | 120 | 160 | 200  | 240  |

**Realización de la prueba**

1. Utilizar solamente el número de tiras necesario para el test. Reservar 6 pocillos para blanco y controles. Dosificar 200 µl de diluyente de las muestras al resto de los pocillos. A continuación, dosificar 10 µl de cada muestra en los pocillos previamente designados.
2. Dosificar 200 µl de control negativo a 3 pocillos y 200 µl de control positivo a 2 pocillos. **NO DILUIR LOS CONTROLES. YA ESTÁN LISTOS PARA USAR.** Dejar un pocillo vacío para el blanco de sustrato.
3. Cubrir la placa con una lámina adhesiva, **agitarla suavemente** e incubar durante 1 hora a 37°C.
4. Desechar la lámina adhesiva. Aspirar el contenido de los pocillos y llenarlos completamente (aproximadamente 350 µl) con solución de lavado diluida. Repetir el proceso de aspiración lavado 3 veces más. Asegurarse de que cada columna de pocillos esté en remojo al menos 15 segundos antes del nuevo ciclo de aspiración. Después del último lavado golpear la placa invertida sobre un papel absorbente para eliminar cualquier exceso de líquido en los pocillos.
5. Transferir 100 µl de conjugado diluido a todos los pocillos de la placa, a excepción del pocillo para el blanco de sustrato.
6. Cubrir la placa con una lámina adhesiva e incubar durante 30 minutos a 37°C.
7. Durante los últimos 5-10 minutos de esta incubación, preparar la solución de sustrato-cromógeno. Para una placa añadir 280 µl de la solución de cromógeno (TMB) a un vial de tampón sustrato (14 ml) y **mezclar bien**. Si no se utiliza toda la placa, preparar la cantidad necesaria según indica la tabla 2. La solución final debe ser incolora, descartar en caso de que se vuelva azul.

TABLA 2

|                    |     |     |     |     |     |      |      |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| Tiras requeridas   | 1   | 2   | 4   | 6   | 8   | 10   | 12   |
| Tampón sustrato ml | 1,0 | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 | 12,0 |
| Cromógeno (TMB) µl | 20  | 40  | 80  | 120 | 160 | 200  | 240  |

**NOTA:** El TMB está disuelto en DMSO. Dado que la temperatura de fusión del DMSO es de 18°C, el cromógeno debe alcanzar una temperatura de 20-25°C y **agitarse bien** antes de usarlo. Es normal que el cromógeno presente un color amarillento.

8. Desechar la lámina adhesiva. Aspirar y lavar la placa como en el punto 4.
9. Añadir 100 µl de sustrato-TMB a todos los pocillos.
10. Incubar sin cubrir durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
11. Añadir 100 µl de solución de parada a cada pocillo, guardando la misma secuencia y con los mismos intervalos observados en la adición del sustrato-TMB.
12. Ajustar el cero del lector con el pocillo del blanco a 450 nm y leer la absorbancia de cada uno de los pocillos en el plazo máximo de 30 minutos. Se recomienda hacer lectura bicromática utilizando filtro de referencia de 620 - 630 nm.

**Control de calidad**

Los resultados de un ensayo son válidos si se cumplen los siguientes criterios:

1. Blanco del sustrato.  
El valor de absorbancia debe ser inferior o igual a 0,100.
2. Media del control negativo (CNx).  
La absorbancia de cada control negativo debe ser menor o igual a 0,200 después de restar el blanco. Si alguno de los valores no entra dentro de este margen debe descartarse y recalcularse la media. Si son dos los valores que están fuera de este margen, la prueba deberá repetirse.

Ejemplo:

| Control negativo | Absorbancia |
|------------------|-------------|
| 1                | 0,045       |
| 2                | 0,043       |
| 3                | 0,041       |
| Total            | 0,129       |

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

En este ejemplo no se ha de descartar ningún valor.

3. Media del control positivo (CPx).

La media de la absorbancia de los controles positivos debe ser igual o superior a 0,600 después de restar el blanco. Si la media es inferior a este valor el análisis deberá repetirse.

Ejemplo:

| Control positivo | Absorbancia |
|------------------|-------------|
| 1                | 1,536       |
| 2                | 1,551       |
| Total            | 3,087       |

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

**Resultados**

1. Calcular el valor umbral añadiendo 0,300 a la media del control negativo.

$$\text{Valor umbral} = CNx + 0,300$$

Ejemplo:  $CNx = 0,043$        $\text{Valor umbral} = 0,043 + 0,300 = 0,343$

2. Dividir la absorbancia de la muestra por el valor umbral.

Positivo: ratio absorbancia/valor umbral  $\geq 1,0$

Negativo: ratio absorbancia/valor umbral  $< 0,9$

Dudoso: ratio absorbancia/valor umbral  $\geq 0,9 < 1,0$

**Interpretación de los resultados**

Un resultado positivo indica infección por *T. cruzi*. Débese tener en cuenta la historia clínica del paciente.

**Limitaciones del procedimiento**

Toda muestra que haya dado un resultado positivo o dudoso debe analizarse de nuevo por duplicado. Si el resultado es repetidamente positivo o dudoso, debería analizarse con otra prueba.

Para el correcto funcionamiento del kit debe seguirse estrictamente las instrucciones descritas. Cualquier desviación puede dar origen a resultados aberrantes.

Como en todos los inmunoensayos muy sensibles, existe la posibilidad de resultados positivos que no se repiten.

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición o infección por *T. cruzi*.

**Características funcionales**

**Evaluaciones**

El funcionamiento del kit **bioelisa CHAGAS** se ha evaluado en varios estudios en comparación con otros ensayos comerciales analizando muestras de donantes de sangre y muestras previamente clasificadas como negativas o positivas de anticuerpos frente a *T. cruzi*.

- En una evaluación realizada en un banco de sangre, se probaron 3024 muestras de donantes en paralelo con los métodos utilizados en rutina para el cribado de anticuerpos frente a Chagas (EIA, HA e IFA). De éstas, 21 fueron reactivas con el **bioelisa CHAGAS**. Siete (7) fueron confirmadas como positivas. Por tanto, la sensibilidad obtenida fue del 100% y la especificidad del 99,5%, considerando todas las muestras inicialmente reactivas.
- En otra evaluación en banco de sangre 2723 muestras se analizaron en paralelo con los métodos utilizados en rutina para el cribado de anticuerpos de Chagas (EIA, HA e IFA). Del total, 72 fueron reactivas con el **bioelisa CHAGAS**. Dos (2) se confirmaron como positivas verdaderas. Por tanto, la sensibilidad obtenida fue del 100% y la especificidad en el cribado fue del 97,4%.

- En un tercer banco de sangre, 2655 muestras se analizaron en paralelo con los métodos utilizados en rutina para el cribado de anticuerpos de Chagas (EIA, HA e IFA). De éstas, 57 muestras fueron reactivas con el **bioelisa CHAGAS**. Diez (10) se confirmaron como positivas. En esta evaluación la sensibilidad obtenida fue del 100% y la especificidad en el cribado del 98,2%.
- Se analizó un panel de 498 muestras previamente clasificadas como positivas (18) ó negativas (480). La sensibilidad obtenida fue del 100% y la especificidad del 98,3%.
- Se ensayó un panel de 115 muestras previamente clasificadas como positivas verdaderas. Los resultados de todas las muestras fueron positivos, obteniéndose una sensibilidad del 100%.
- Se analizaron 796 muestras caracterizadas como negativas, de las cuáles 4 presentaron resultado positivo con el **bioelisa CHAGAS**. En este estudio la especificidad obtenida fue del 99,5%.

### **Precisión**

Reproducibilidad intra-ensayo:

Los coeficientes de variación obtenidos para los valores de absorbancia de 24 replicados de una muestra positiva fueron del 2,5%, 4,2% y 3,1% en tres lotes estudiados.

Reproducibilidad inter-ensayo:

Tres muestras positivas de distintos niveles se probaron en 3 ensayos diferentes. Los coeficientes de variación obtenidos para los ratios absorbancia/valor umbral de las 3 muestras fueron del 4,6%, 3,5% y 8,7%.

## bioelisa: Guía de problemas

| <b>Problema</b>                                       | <b>Posibles causas</b>  | <b>Solución</b>  |
|---|---|--|
| <b>1. Controles fuera de validación.</b>              | 1a. Temperatura, incubación o pipeteo incorrecto.   | <i>Comprobar procedimiento. Repetir el ensayo.</i>   |
|   | 1b. Preparación incorrecta de reactivos, error en las diluciones. Reactivos no mezclados correctamente.     | <i>Comprobar procedimiento. Repetir el ensayo.</i>   |
|   | 1c. Contaminación cruzada entre controles.  | <i>Pipetear cuidadosamente. No intercambiar los tapones de los viales. Repetir el ensayo.</i>  |
|   | 1d. Filtro de lectura incorrecto.   | <i>Comprobar que el filtro de lectura sea de 450 nm. Si no se usa filtro de referencia de 620-630 nm, las absorbancias aumentan aproximadamente 50 miliunidades.</i> |
|   | 1e. Interferencia en el camino óptico.  | <i>Comprobar el lector. Limpiar o secar el fondo de los pocillos. Comprobar que no haya burbujas de aire. Repetir la lectura.</i>                                    |
|   | 1f. Se han utilizado componentes de lotes diferentes.   | <i>No utilizar componentes de lotes diferentes puesto que están ajustados para cada lote en particular.</i>  |
|   | 1g. Reactivos caducados.  | <i>Comprobar la caducidad del kit y de sus componentes. No utilizar un kit caducado.</i>   |
| <b>2. Sin color o poco color al final del ensayo.</b> | 2a. Uno o más reactivos no añadidos o añadidos en secuencia equivocada.                                     | <i>Comprobar el procedimiento. Repetir el ensayo.</i>  |
|   | 2b. Conjugado inactivo: mala conservación.  | <i>Comprobar si ha habido contaminación, comprobar el procedimiento. Repetir el ensayo.</i>  |
|   | 2c. Microplaca inactiva: conservación incorrecta.   | <i>Mantener siempre las tiras no utilizadas en la bolsa minigrip, bien cerrada, con el desecante dentro. Repetir el ensayo.</i>                                      |
|   | 2d. Sustrato inactivo: conservación o dilución incorrecta. Contaminación cruzada con la solución de parada. | <i>Utilizar siempre una dilución fresca de TMB y tampón sustrato. Comprobar el procedimiento. Repetir el ensayo.</i>   |



## bioelisa: Guía de problemas

| Problema  | Posibles causas  | Solución   |
|---|--|--|
| 3. Demasiado color en todos los pocillos de la microplaca.                          | 3a. Sustrato contaminado, oxidado o preparado incorrectamente.   | Comprobar que el sustrato preparado sea incoloro, descártelo si está azul. Asegúrese que el TMB está completamente líquido antes de utilizarlo. Asegurar la correcta mezcla del TMB en el tampón sustrato. Utilizar viales o contenedores desechables o lavados con solución ácida. Repetir el ensayo. |
|   | 3b. Reactivos contaminados o preparados incorrectamente.   | Comprobar contaminación (aspecto turbio). Comprobar diluciones. Repetir el ensayo.   |
|   | 3c. Solución de lavado (1x) contaminada.   | Comprobar la calidad del agua destilada/desionizada utilizada para preparar la dilución. Repetir el ensayo.  |
|   | 3d. Lavado insuficiente o no consistente: Llenado o aspiración insuficiente o no uniforme, número de ciclos de lavado insuficiente. Lavador contaminado. | Comprobar el lavador. Llenar los pocillos hasta el tope y aspirar completamente. <b>Incrementar el número de ciclos de lavado.</b> Golpear la placa invertida contra papel absorbente. Repetir el ensayo.  |
|   | 3e. Se ha utilizado solución de lavado de otro fabricante.   | Utilizar sólo la solución de lavado de <b>biokit</b> .   |
|   | 3f. Dilución incorrecta de las muestras.   | Comprobar el procedimiento. Repetir el ensayo.   |
| 4. Reproducibilidad pobre o elevado número de muestras reactivas que no se repiten. | 4a. Problemas de lavado.   | Ver apartados 3c, 3d, 3e.  |
|   | 4b. Pipetas mal calibradas o puntas mal encajadas. Técnica de pipeteo incorrecta.  | Utilizar pipetas calibradas con puntas bien ajustadas. Pipetear cuidadosamente sin burbujas ni salpicaduras. Repetir el ensayo.  |
|   | 4c. Reactivos muy fríos o no correctamente mezclados antes de usar.  | Atemperar reactivos y mezclarlos bien antes de utilizarlos.  |
|   | 4d. Corrientes de aire sobre la microplaca durante las incubaciones.   | Mantener la microplaca protegida de las corrientes de aire.  |
|   | 4e. Demasiado tiempo en la adición de muestras y/o reactivos. Inconsistencia en los intervalos de tiempo, burbujas de aire.                              | Desarrollar una técnica uniforme y consistente.  |
|   | 4f. Interferencia en el camino óptico.   | Ver 1e.  |