



DiaMetra



LH

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la LH en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO009

1. USO PREVISTO

El kit Diametra LH es un método inmunoenzimático en fase sólida para la determinación cuantitativa de la hormona luteinizante (LH) en suero o plasma humano.

El kit LH está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

2. INTRODUCCIÓN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

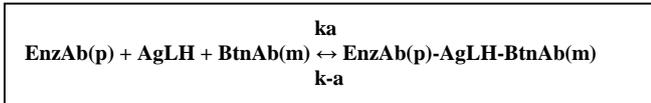
La hormona luteinizante (LH) es una glicoproteína compuesta por subunidades de peso molecular de aproximadamente 30 000 dalton. La subunidad α es similar a la de las otras hormonas pituitarias [hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica (HCG)], mientras que la subunidad β es única. Esta confiere a la molécula la actividad biológica. La subunidad α consta de 89 residuos de aminoácidos, mientras que la subunidad β contiene 129 aminoácidos. El contenido de carbohidratos varía del 15% al 30%. La utilidad clínica de la determinación de la hormona luteinizante (LH) en la evaluación de la homeostasis de la regulación de la fertilidad a través del eje hipotalámico-pituitario-gonadal ha sido ampliamente demostrada (1,2). Además, la aparición de las tecnologías relacionadas con la fecundación *in vitro* (FIV) dirigidas a la resolución de problemas de infertilidad ha dado un nuevo impulso al rápido desarrollo de métodos para la determinación de la LH: desde el ensayo biológico técnicamente complejo (3) hasta el ensayo más simple y rápido de tipo inmunoenzimático.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Ensayo inmunoenzimático.

En este método, los calibradores, muestras y/o controles (que contienen el antígeno LH nativo), se añaden a los pocillos de la microplaca sensibilizados con estreptavidina. A continuación, se añaden a los pocillos, en exceso, anticuerpos anti-LH monoclonales biotinilados y anticuerpos conjugados con la enzima; ambos tipos de anticuerpos son de alta afinidad y especificidad, y reconocen epítopos distintos. En los pocillos de la microplaca, la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos se produce sin competencia o impedimento estérico, y se forma un complejo sándwich soluble.

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



BtnAb(m) = anticuerpo biotinilado monoclonal (en exceso)

AgLH = antígeno nativo (cantidad variable)

EnzAb = anticuerpo marcado con una enzima (en exceso)

EnzAb-AgLH-BtnAb(m) = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

ka = constante de asociación

k-a = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se deposita en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción se ilustra a continuación:

EnzAb-AgLH-BtnAb(m) + estreptavidina C.W. ⇒ complejo inmovilizado

Estreptavidina C.W. = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

Complejo inmovilizado = enlace sándwich anticuerpo-antígeno unido a la superficie

Tras lograr el equilibrio, la fracción unida del anticuerpo se separa del antígeno no unido mediante decantación o aspiración. La actividad enzimática en la fracción unida del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo libre. La actividad enzimática se cuantifica mediante la reacción con un sustrato que produce una coloración. Usando distintos calibradores de concentración conocida de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración desconocida del antígeno.

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1 Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Estándares (STD) de LH (6 frascos, 1 mL cada uno)

STD0 **REF DCE002/0906-0**

STD1 **REF DCE002/0907-0**

STD2 **REF DCE002/0908-0**

STD3 **REF DCE002/0909-0**

STD4 **REF DCE002/0910-0**

STD5 **REF DCE002/0911-0**

2. LH Control (1 frasco, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Quality Control Report) **REF DCE045/0903-0**

3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpos anti LH conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) y anti LH biotinilado **REF DCE002/0902-0**

4. Microplaca recubierta (1 microplaca)

Estreptavidina absorbida en la microplaca **REF DCE002/0903-0**

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel) **REF DCE004-0**

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel) **REF DCE005-0**

7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

4.2 Notas

- Conservar todos los reactivos a 2-8 °C, protegidos de la luz.
- Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar.
- Este método permite determinar concentraciones de LH de 5 mIU/mL a 200 mIU/mL
- Los estándares tienen aproximadamente las siguientes concentraciones:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
mIU/mL	0	5	25	50	100	200

Para muestras con una concentración superior a 200 mIU/mL, diluir la muestra con estándar 0. Una vez abiertos, los estándares permanecen estables durante 6 meses a 2-8 °C.

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD TRAS LA APERTURA INICIAL

- Los componentes del kit deben conservarse a 2-8 °C y no deben usarse después de la fecha de caducidad.
- Los reactivos abiertos se mantienen estables durante 60 días si se conservan a 2-8 °C.

6. Materiales e instrumentos necesarios no suministrados en el kit

- Agua destilada o desionizada y un cilindro de 1 litro limpio para la dilución de la solución de lavado.
- Pipetas adecuadas para suministrar volúmenes de 50 µl con una precisión superior a 1,5%.
- Pipetas secuenciales para suministrar volúmenes de 0,100 mL y 0,300 mL con una precisión superior a 1,5%.
- Lavador automático de microplaca o una botella comprimible (opcional).
- Lector de microplaca con capacidad de leer las DO con absorbancias de 450 nm, 405 nm y 620 nm.
- Papel absorbente para secar los pocillos de la microplaca.
- Envoltura de plástico para cubrir la microplaca durante la incubación.
- Aspirador (opcional) para las fases de lavado.
- Temporizador.
- Materiales de control de calidad

7. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

7.1 MEDIDAS DE SEGURIDAD

- Este kit solo debe usarse para diagnóstico *in vitro*
- No apto para uso interno o externo en humanos o animales
- Todos los productos que contienen suero humano han resultado negativos en la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B, los anticuerpos de VIH 1 y 2, y de VHC. Todos los materiales han sido analizados mediante ensayos. Puesto que ningún método conocido puede ofrecer una seguridad completa de la ausencia de agentes infecciosos, todos los productos que contienen suero humano deben manipularse como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades
- Seguir las buenas prácticas de laboratorio para manipular los productos sanguíneos.
- Evitar el contacto con los reactivos que contienen peróxido de hidrógeno, ácido sulfúrico y conservantes que pueden ser tóxicos si se ingieren. No utilizar la pipeta con la boca.

- Realizar la eliminación de los residuos observando las leyes vigentes

7.2 PRECAUCIONES TÉCNICAS

- Evitar la exposición de la solución TMB/H₂O₂ a la luz directa del sol, metales u oxidantes.
- Evitar la contaminación microbiana de los reactivos.
- Los datos de ejecución que se muestran aquí se han obtenido usando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles.
- El pipeteado de muestras no debe exceder los 10 minutos para evitar resultados incorrectos.
- Si se usa más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta.
- La adición de la solución de sustrato inicia una reacción cinética que se termina con la adición de la solución de interrupción. Por lo tanto, la adición del sustrato y de la solución de interrupción debe realizarse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación temporal durante la reacción.
- Los lectores de microplacas miden verticalmente. No tocar el fondo de los pocillos.
- Si no se retira adecuadamente la solución de incubación y lavado durante las fases de aspiración o decantación se pueden producir resultados falsos o repeticiones pobres.
- Usar componentes del mismo lote. No mezclar reactivos de distintos lotes.

8. OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Usar muestras séricas y observar las precauciones habituales en la recogida de muestras obtenidas por vía venosa.
- Obtener las muestras de suero por la mañana y en ayunas para una comparación precisa que permita establecer valores normales.
- Para el suero, la sangre se debe recoger en un tubo de extracción por vía venosa, sin aditivos ni anticoagulantes. Dejar que la sangre se coagule. Centrifugar las muestras para separar el suero de las células.
- Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2-8 °C durante un período máximo de 5 días. Si no se van a usar en este período, pueden conservarse a una temperatura de -20°C durante 30 días como máximo.
- No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.
- Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,040 mL de la muestra.

9. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

9.1 Preparación de los reactivos

- Esperar hasta que los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28 °C).
- Calcular los pocillos necesarios para la determinación por duplicado para cada calibrador, control y muestra. Volver a colocar los pocillos no usados en la bolsa de aluminio. Sellar y conservar a 2-8 °C.

9.2 Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (50x) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de

1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2 ± 8 °C durante al menos 30 días.

10. Procedimiento

Reactivos	Estándar	Muestras/ Control	Blanco
Muestras/ Control		20 µL	
Estándares S ₀ -S ₅	20 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22±28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22±28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente al blanco.			

11. RESULTADOS

11.1 Validez del ensayo

La DO del calibrador 5 debe ser $\geq 1,3$.

11.2 Control de calidad

Cada laboratorio debe analizar los controles internos a niveles de los rangos bajo, medio y alto para supervisar el rendimiento del ensayo. Estos controles deben tratarse como muestras desconocidas y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias.

Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

11.3 Conversión de las do

Las densidades ópticas (DO) de algunos calibradores y muestras pueden ser superiores a 2,0. En ese caso, podrían estar fuera del rango de medición del lector de microplacas. Por lo tanto, en estos casos es necesario realizar una lectura a 405 nm (= longitud de onda de entrada pico) además de a 450 nm (longitud de onda pico) y a 620 nm (filtro de referencia para la disminución de interferencias debidas al plástico).

Si se utilizan lectores no aptos para la lectura a tres longitudes de onda simultáneamente, se recomienda realizar lo siguiente:

- leer la microplaca a 450 nm y a 620 nm.
- volver a leer la microplaca a 405 nm y a 620 nm.
- seleccionar los pocillos cuyas DO a 450 nm sean superiores a 2,0.
- seleccionar las DO correspondientes leídas a 405 nm y multiplicar estos valores a 405 nm por el factor de

conversión 3,0 (donde $DO\ 450/DO\ 405 = 3,0$), es decir:
 $DO\ 450\ nm = DO\ 405\ nm \times 3,0$

Advertencia: El factor de conversión 3,0 es solo una sugerencia. Para mayor precisión, se recomienda calcular el factor de conversión específico del lector empleado.

11.4 Procesamiento de datos – método automático

Utilizar los métodos: modelo logístico de 4 parámetros (preferido) o modelo spline cúbico suavizado como algoritmo de cálculo.

NOTA: Si para calcular los resultados se ha usado un programa de cálculo, es imprescindible que los valores calculados para los calibradores se encuentren dentro del 10% de las concentraciones asignadas.

11.5 Procesamiento de datos – método manual

- Se usa una curva dosis-respuesta para determinar la concentración de LH en muestras desconocidas.
- Registrar las DO obtenidas en el informe impreso del lector de microplacas.
- Trazar en papel milimetrado una curva dosis-respuesta (DRC) usando la DO media para cada calibrador por duplicado frente a las concentraciones correspondientes de LH en mIU/mL.
- Trazar la curva que pasa por los puntos.
Para determinar la concentración de LH de una muestra desconocida, localizar la DO media de los duplicados correspondientes en el eje vertical del gráfico, localizar el punto de intersección de la curva y leer la concentración (en mIU/mL) en el eje horizontal del gráfico (se puede calcular el promedio de los duplicados de la muestra desconocida).

12. VALORES ESPERADOS

Los intervalos de referencia se indican del siguiente modo:

	LH Diametra (mIU/mL)
HOMBRES:	0,7 – 7,4
MUJERES:	
Fase folicular	0,5 – 10,5
Fase ovulatoria	18,4 – 61,2
Fase lútea	0,5 – 10,5
Menopausia	8,2 – 40,8

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de un intervalo de valores esperados con un método dado para una población dada de personas “normales” depende de numerosos factores: la especificidad del método, la población examinada y la precisión del método que depende del usuario. Por estos motivos, cada laboratorio solo deberá usar el intervalo de valores esperados establecido por el fabricante hasta que los analistas puedan determinar un intervalo propio usando el método con una población autóctona de la zona en la que se encuentre el laboratorio

13. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La hormona LH es suprimida por los estrógenos, pero en mujeres que toman anticonceptivos orales, los niveles pueden ser bajos o normales. Dietas demasiado radicales y pérdidas de peso repentinas pueden reducir la concentración de gonadotropina. La hormona luteinizante depende de factores distintos de la homeostasis pituitaria. Por lo tanto, limitarse a una determinación no es suficiente para realizar una estimación del estado clínico.

14. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

14.1. Precisión

14.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es $\leq 9.21\%$.

14.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 7.91\%$.

14.2. Correlación con la dosis RIA

El kit LH (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 36 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$\text{Diametra} = 0,91 * (\text{ensayo comercial}) + 0,05$$

$$r^2 = 0,971$$

El kit LH Diametra (Y) se ha comparado con el kit LH Diametra del método anterior (X). Se probaron 36 muestras de suero.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 1,08 * (X) - 1,22$$

$$r^2 = 0,981$$

14.3. Sensibilidad

La concentración mínima de LH que puede distinguirse del estándar cero es de 0,22 mIU/mL.

14.4 Especificidad

La reactividad cruzada del kit LH Diametra a las sustancias potencialmente interferentes se estimó mediante la adición de estas sustancias, en concentraciones diferentes, a una matriz de suero. La reactividad cruzada se calculó mediante una relación entre dosis de sustancia interferente y dosis de hormona luteinizante necesaria para producir la misma DO.

Sustancia	Reactividad cruzada
LH	100 %
HCG	0,007 %
Prolactin	N.D.
FSH	N.D.
TSH	N.D.

14.4 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 5.63 – 11.25 – 22.5 – 45 – 90 mIU/mL de LH ha dado un valor medio (\pm DE) de $97.17\% \pm 4.00\%$.

La prueba de dilución conductada en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 - 16 veces con estándar 0 dio una media (\pm DE) de $99.13\% \pm 7.37\%$.

14.5 Efecto "Hook"

Este método no afecta "Hook" se observó hasta 400 mIU/mL.

15. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kosasa T.S., "Measurement of Human Luteinizing Hormone." *Journal of Reproductive Medicine*, **26** (1981) pg. 201-6.
2. Danzer H., Braunstein G.D., et al., "Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropic Concentrations and Fetal Sex Predictions." *Fertility and Sterility*, **34** (1980) pg. 336-40.
3. Braunstein G.D., et al., "Serum Human Luteinizing Hormone Levels through Normal Pregnancy", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **126** (1976) pg. 678-81.
4. Goldstein D.P., and Kosasa T.S., "The Subunit Radioimmunoassay for LH Clinical Application." *Gynecology*, **6** (1975) pg. 145-84.
5. Batzer F., "Hormonal Evaluation of Early Pregnancy", *Fertility and Sterility*, **34** (1980) pg. 1-12.
6. Braunstein, G.D., et al., "First-Trimester Luteinizing Hormone Measurements as an Aid to the Diagnosis of Early Pregnancy Disorders", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **131** (1978) pg. 25-32.
7. Lenton E., Neal L. and Sulaiman R., "Plasma Concentrations of Human Gonadotropin from the time of Implantation until the Second Week of Pregnancy", *Fertility and Sterility*, **37** (1982) pg. 773-78.

Ed 06/2011

DCM009-10

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595

Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Giustozzi 35/35a – Z.I Paciana – 06034

FOLIGNO (PG) Italy

Tel. 0039-0742-24851

Fax 0039-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

IT
Spiegazione dei simboli

GB
Explanation of symbols

FR
Explication des symboles

ES
Significado de los símbolos

DE
Verwendete Symbole

PT
Explicação dos símbolos

	<p>DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro</p>		<p>DE Hergestellt von ES Fabricante FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por</p>
REF	<p>DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo</p>	 yyyy-mm	<p>DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricación FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção</p>
 yyyy-mm-dd	<p>DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes del último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)</p>		<p>DE Biogefährdung ES Riesgo biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico</p>
	<p>DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones de uso FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso</p>		<p>DE Chargenbezeichnung ES Código del lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote</p>
 $\Sigma = xx$	<p>DE Ausreichend für "h" Tests ES Contenido suficiente para "h" ensayos FR Contenu suffisant pour "h" tests GB Contains sufficient for "h" tests IT Contenuto sufficiente per "h" saggi PT Contém o suficiente para "h" testes</p>		<p>DE Inhalt ES Contenido del kit FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit</p>
 Max Min	<p>DE Temperaturbereich ES Límites de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação</p>		

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS/TROUBLESHOOTING

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del substrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation