



## Návod na použitie

### ELISA anti-ASCA-II-A

Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro určená na profesionálne použitie

**REF** E-346

**UDI-DI 08588002310294**



**Biogema, výrobné družstvo, Košice**

Garbiarska 2, 040 01 Košice, Slovenská republika

Tel.: +421 556 225 719

+421 904 228 131

E-mail: [biogema3@biogema.sk](mailto:biogema3@biogema.sk)

[www.biogema.sk](http://www.biogema.sk)



## OBSAH

1 Záznamy o dokumente .....	3
2 Účel určenia .....	3
3 Popis .....	3
4 Princíp testu .....	3
5 Zloženie súpravy .....	4
6 Materiál potrebný, ale nedodávaný .....	5
7 Skladovanie a doba expirácie .....	5
8 Upozornenie .....	5
9 Príprava vzoriek .....	7
10 Príprava pracovných roztokov .....	7
11 Pracovný postup .....	7
12 Pipetovacia schéma .....	8
13 Kontrola kvality a validácia testu .....	9
14 Zjednodušená pracovná schéma spracovania súpravy .....	9
15 Interpretácia výsledkov .....	10
16 Parametre analytického výkonu .....	11
17 Odporúčania pri práci so súpravou .....	11
18 Zoznam použitých symbolov .....	13
19 Literatúra .....	14

## 1 Záznamy o dokumente

Revízia č.: 1/2024

Dátum účinnosti: 1.1.2024

Popis zmien: Úpravy a doplnenie podľa aktuálnych požiadaviek

## 2 Účel určenia

Súprava je určená na kvantitatívne stanovenie protilátok typu IgA proti antigénu mannanu zo stien *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) vo vzorkách ľudského séra v bežnej populácii. Stanovenie protilátok je založené na imunoenzymatickej metóde a slúži ako doplnkové vyšetrenie na zlepšenie diagnostických možností nešpecifických črevných zápalov. Súprava je určená len na profesionálne diagnostické použitie in vitro v laboratóriu.

## 3 Popis

Kmene *Saccharomyces cerevisiae* sú využívané v potravinárskych technológiách, a preto sú obsiahnuté v rade potravinárskych výrobkov. V poslednej dobe sa začalo využívať stanovenie protilátok proti *Saccharomyces* ako doplnkové vyšetrenie na zlepšenie diagnostických možností nešpecifických črevných zápalov. Tieto protilátky boli zistené u pacientov s Crohnovou chorobou, ale len výnimočne u pacientov s ulceróznou kolitídou. Podľa literárnych údajov sa IgA a IgG protilátky proti *Saccharomyces* vyskytujú u 39-68% pacientov s Crohnovou chorobou, ale len u max. 14% pacientov s ulceróznou kolitídou.

Zvýšené hladiny protilátok IgA a IgG proti *Saccharomyces* boli zistené aj u iných ochorení, ako sú napr. celiakia, spondyloartropatia, ankylozujúca spondylitída, a u niektorých autoimúnnych pečňových ochorení. U 14-43% pacientov s celiakiou boli zistené aj protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae*.

## 4 Princíp testu

Stanovenie je založené na princípe nepriamej ELISA metódy na detekciu špecifických protilátok. Antigén je imobilizovaný na povrchu jamiek mikrotitračnej doštičky. Testované vzorky nariadeného ľudského séra sa inkubujú v jamkách mikrotitračnej doštičky. V tejto fáze dochádza k naviazaniu špecifických protilátok z ľudského séra na imobilizovaný antigén. Po inkubácii sa premytím odstráni nezreagované komponenty ľudského séra a pridá sa konjugát chrenovej peroxidázy s protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu IgA. Po inkubácii a odstránení prebytočného konjugátu sa pridá substrát TMB a enzymová reakcia sa zastaví pridaním kyseliny sírovej. Absorbancia testovaných vzoriek sa porovnáva s absorbanciou štandardov. Intenzita sfarbenia je úmerná množstvu špecifických protilátok prítomných v sére.

## 5 Zloženie súpravy

**PLATE** Mikrotitračná doštička potiahnutá antigénom **1 ks**

12x8 jamkové stripy umiestnené v rámičku, zabalené v ochrannom obale s vysúšadlom.

**CONJUGATE** Konjugát HRP anti-IgA **1 x 12 ml**

Roztok obsahujúci zvieraciu protilátku proti ľudskému IgA značenú peroxidázou.

Roztok je pripravený na použitie.

**SUBSTRATE** Substrát TMB **1 x 8 ml**

Roztok obsahujúci substrát TMB (3,3',5,5' - tetrametylbenzidín).

Roztok je pripravený na použitie.

**STOP** Kyselina sírová **1 x 8 ml**

Roztok obsahujúci zastavovacie činidlo (zriedenú kyselinu sírovú).

Roztok je pripravený na použitie.

**CAL 1** **CAL 6** Štandardy 1 až 6 **6 x 1 ml**

Roztoky obsahujúce špecifické ľudské protilátky IgA proti mannanu ASCA s koncentráciou 0 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 U.ml<sup>-1</sup>.

Štandardy sú pripravené na použitie.

**CONTROL -** Kontrolná vzorka negatívna **1 x 1 ml**

Roztok neobsahujúci špecifické ľudské protilátky IgA proti mannanu ASCA slúžiaci ako negatívna kontrola. Koncentrácia je stanovená v osvedčení o súprave.

Kontrolná vzorka negatívna je pripravená na použitie.

**CONTROL +** Kontrolná vzorka pozitívna **1 x 1 ml**

Roztok obsahujúci špecifické ľudské protilátky IgA proti mannanu ASCA slúžiaci ako pozitívna kontrola. Koncentrácia je stanovená v osvedčení o súprave.

Kontrolná vzorka pozitívna je pripravená na použitie.

**SAMPLEBUF** Zried'ovací roztok **1 x 100 ml**

Roztok obsahujúci TRIS-HCl tlmivý roztok, bovinný sérový albumín, 0,2% azid sodný, 0,02% timerosal a modré farbivo, pH roztoku 7,0 ± 0,2.

Roztok je pripravený na použitie.

**WASHBUF** Vymývací roztok **1 x 50 ml**

Uhličitanový tlmivý roztok s obsahom Tween 20 a 0,01% timerosalu, pH roztoku 9,6.

Koncentrovaný roztok pred použitím zriedte podľa popisu v bode 10 tohto návodu.

**Osvedčenie o súprave** **1 ks**

## **6 Materiál potrebný, ale nedodávaný**

### Pre ručné spracovanie súpravy:

Jedno a viacnásobné pipety

Špičky pre jednorazové použitie

Premývacie zariadenie

Časovač alebo stopky

Spektrofotometer pre mikrotitračné doštičky

### Pre automatizované spracovanie súpravy:

Automatizovaný systém na spracovanie súprav ELISA

Jednorazový materiál podľa požiadaviek automatizovaného systému

## **7 Skladovanie a doba expirácie**

Pri dodržaní skladovacích podmienok je súprava stabilná do dátumu uvedenom na obale. Súpravu skladujte pri teplote od +2°C do +8°C na suchom mieste. Súpravu nezmrazujte. Po otvorení ochranného obalu mikrotitračnej doštičky odporúčame stripy spotrebovať do 1 mesiaca.

## **8 Upozornenie**

Súprava je určená len na profesionálne diagnostické použitie in vitro v laboratóriu.

Pozorne si prečítajte návod na použitie.

Pre správne spracovanie súpravy je potrebné vykonať všetky kroky presne podľa návodu na použitie.

Nepoužívajte mikrotitračnú doštičku, ak je ochranný obal poškodený.

Pred spracovaním súpravu vytemperujte na laboratórnu teplotu, t.j. na 18°C až 25°C.

Priložené vysušadlo v ochrannom obale mikrotitračnej platničky nepoužívať.

Súprava je určená len na jedno použitie.

### Pomoc a vigilancia

Pre žiadosť o technickú pomoc, alebo prípadný výskytu závažnej nehody kontaktujte výrobcu na emailovej adrese [biogema4@biogema.sk](mailto:biogema4@biogema.sk), prípadne telefonicky na +42155 6228 131. Pri výskyte závažnej nehody je používateľ tejto súpravy povinný takúto udalosť nahlásiť aj na tel. číse +421250 7012 15, e-mailom na [pomocky@sukl.sk](mailto:pomocky@sukl.sk) dozornému orgánu ŠÚKL, Kvetná 11, 825 08 Bratislava a vždy postupovať podľa regulačných požiadaviek v platnom znení.

## Bezpečnosť pri práci

Jednotlivé substancie súpravy obsahujú konzervačné činidlá azid sodný a timerosal. Azid sodný reaguje s olovom a meďou za vzniku výbušných azidov. Azid sodný a timerosal môžu pri priamom kontakte s pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade kontaktu s pokožkou postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody. Kyselina sírová obsiahnutá v stop činidle **STOP** v koncentrácii  $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$  môže pri priamom kontakte s očami, alebo kožou spôsobiť podráždenie. V prípade zasiahnutia očí, alebo kože postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.

Azid sodný, timerosal a kyselina sírová, v koncentráciách použitých v súprave, sú zdraviu škodlivé. Vzhľadom k nízkemu obsahu škodlivých látok v substanciiach súpravy životné prostredie nie je ohrozené. Podrobnejšie informácie je možné získať z kariet bezpečnostných údajov jednotlivých substancii.

## Infekčné a mikrobiálne riziká

Kontrolné vzorky a štandardy obsahujú ľudské sérum. Ľudské sérum použité na prípravu týchto substancii vykazovalo negatívny výsledok testu na prítomnosť antigénu HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV. Napriek negatívne mu testovaniu použitých sér je potrebné s týmito substanciami pracovať ako s potenciálne infekčnými - pri práci používajte jednorazové ochranné rukavice.

## Likvidácia odpadu

Nepoužité zvyšky patientskych vzoriek a substancie obsahujúce ľudské sérum likvidujte ako infekčný materiál.

Nepoužité zvyšky súpravy obsahujúce nebezpečné chemické látky odporúčame zlikvidovať v súlade s miestnymi požiadavkami a v súlade s ustanoveniami zákona NR SR č.223/2001 Z.z. a vyhlášky MŽP SR č. 365/2015 Z.z. v platnom znení.

Nekontaminovaný kartónový obal súpravy vhodte do príslušnej recyklačnej nádoby.

## 9 Príprava vzoriek

Súprava je určená na stanovenie vzoriek ľudského krvného séra. Čerstvé vzorky sa v priebehu stanovenia uskladňujú do 72 hodín pri teplote od +2°C do +8°C. Vzorky séra sa dlhodobo uskladňujú pri - 20°C. Vzorky séra po rozmrazení nie je možné opakovane zamraziť. Na stanovenie nepoužívajte lipemické, hemolyzované, ikterické, alebo inak kontaminované krvné séra.

Pacientské séra sa riedia v pomere 1:101, t.j. 10 µl pacientského séra sa zriedi pridaním 1ml zriedovacieho roztoku. Takto zriedené pacientské séra sú pripravené na použitie.

## 10 Príprava pracovných roztokov

Vymývací roztok pred použitím zriedte v pomere 1:20 ( 1 diel roztoku a 19 dielov destilovanej vody). Obsah fľaštičky vymývacieho roztoku (50 ml) doplňte do 1000 ml destilovanou vodou. Roztok je po zriedení stabilný 1 týždeň pri skladovaní v teplotnom rozmedzí +2°C do +8°C.

Štandardy a kontrolné vzorky sú nariadené v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

Konjugát HRP je nariadený v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

TMB substrát je nariadený v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

Kyselina sírová je nariadená v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

## 11 Pracovný postup

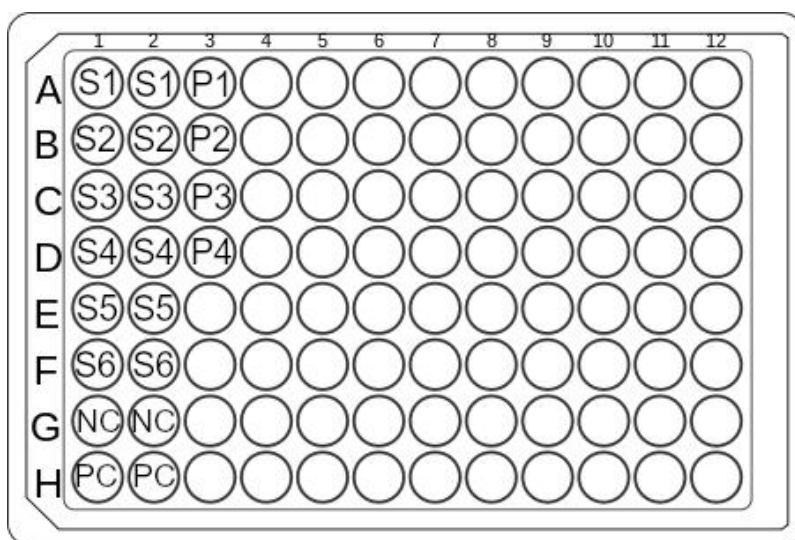
Všetky reagenty musia byť pred začiatkom stanovenia vytemperované na laboratórnu teplotu +18°C až +25°C. Nepoužitú stripy uchovávajú v uzatvorenom obale s vysušadlom v teplotnom rozmedzí od +2°C do +8°C.

1. Pipetujte do jamiek stripov:
  - po 100 µl štandardov
  - po 100 µl negatívnej kontrolnej vzorky
  - po 100 µl pozitívnej kontrolnej vzorky
  - po 100 µl zriedených pacientských vzoriek
2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote
3. Po ukončení inkubácie stripy 4 x dobre premyte zriedeným vymývacím roztokom.

*Poznámka: Pokiaľ nie je k dispozícii premývacie zariadenie pre mikrotitračné doštičky, premývanie spočíva v napipetovaní 250 µl zriedeného vymývacieho roztoku do všetkých jamiek. Po 30 sekundách sa vymývací roztok zo stripov prudko vyleje a okraje doštičky sa usušia filtračným papierom.*

4. Do jamiek napipetujte po 100 µl konjugátu HRP anti-IgG a inkubujte pri laboratórnej teplote 30 minút.
5. Stripy znova 4 x dobre premyte zriedeným vymývacím roztokom
6. Do jamiek napipetujte bez prerušenia po 50 µl substrátu TMB. Pipetovanie musí byť ukončené do 2 minút !
7. Vyfarbuje sa 15 minút v tme.
8. Po uplynutí doby vyfarbenia sa reakcia zastaví pridaním 50 µl kyseliny sírovej do každej jamky.
9. Intenzitu sfarbenia merajte na fotometrickom čítači mikrotitračných doštičiek pri vlnovej dĺžke 450 nm.  
*Ako referenčný filter môže byť použitý filter s vlnovou dĺžkou od 600 do 690 nm. Meranie ukončíte najneskôr do 1 hodiny po skončení vyvíjania, doštičku medzitým uchovávajte v tme.*

## 12 Pipetovacia schéma



Označenie	Objem	Popis
S1 - S6	100 µl	Štandardy S1 - S6
NC	100 µl	Kontrolná vzorka negatívna
PC	100 µl	Kontrolná vzorka pozitívna
P1 - P <sub>x</sub>	100 µl	Zriedené patientské vzorky



## 13 Kontrola kvality a validácia testu










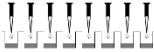

Vykonané meranie je validné ak:

Absorbancia nulového štandardu S1 **CAL 1** je menej ako 0,2.

Absorbancia najvyššieho štandardu S6 **CAL 6** je viac ako 0,8.

Hodnoty koncentrácií negatívnej a pozitívnej kontrolnej vzorky musia spĺňať intervaly uvedené v osvedčení o súprave.

## 14 Zjednodušená pracovná schéma spracovania súpravy

- 
- |                                |  |        |   |
|--------------------------------|--|--------|---|
| 01. Pipetujte po <b>100 µl</b> | /kontrolné vzorky, štandardy, patientské vzorky/ | 100 µl |  |
|                                | <b>CONTROL-</b> <b>CONTROL+</b> <b>CAL</b>       |        |   |
- 
- |   |  |           |   |
|---|--|-----------|---|
| 2. Inkubujte <b>30 minút</b> pri laboratórnej teplote |  | 30 min.   |  |
|   |  | 18 - 25°C |   |
- 
- |  |                            |     |   |
|--|----------------------------|-----|---|
| 3. 4x dobre premyte vymývacím roztokom | /250 µl, reakčný čas 30 s/ | 4 x |  |
|  | <b>WASHBUF</b>             |     |   |
- 
- |                               |                  |        |   |
|-------------------------------|------------------|--------|---|
| 4. Pipetujte po <b>100 µl</b> | /konjugát HRP /  | 100 µl |  |
|                               | <b>CONJUGATE</b> |        |   |
- 
- |   |  |           |   |
|---|--|-----------|---|
| 5. Inkubujte <b>30 minút</b> pri laboratórnej teplote |  | 30 min.   |  |
|   |  | 18 - 25°C |   |
- 
- |  |                            |     |   |
|--|----------------------------|-----|---|
| 6. 4x dobre premyte vymývacím roztokom | /250 µl, reakčný čas 30 s/ | 4 x |  |
|  | <b>WASHBUF</b>             |     |   |
- 
- |                              |                  |       |   |
|------------------------------|------------------|-------|---|
| 7. Pipetujte po <b>50 µl</b> | /substrát TMB/   | 50 µl |  |
|                              | <b>SUBSTRATE</b> |       |   |
- 
- |  |  |   |           |   |
|--|--|---|-----------|---|
| 8. Inkubujte <b>15 minút</b> pri laboratórnej teplote <b>v tme</b> |  |  | 15 min.   |  |
|  |  |   | 18 - 25°C |   |
- 
- |                              |                   |       |   |  |
|------------------------------|-------------------|-------|---|--|
| 9. Pipetujte po <b>50 µl</b> | /Kyselina sírová/ | 50 µl |  |  |
|                              | <b>STOP</b>       |       |   |  |
- 
- |                           |  |        |   |
|---------------------------|--|--------|---|
| 10. Vyhodnotenie výsledku | /fotometrický čítač s vlnovou dĺžkou 450 nm/ | 450 nm |  |
|---------------------------|--|--------|---|
-

## 15 Interpretácia výsledkov

Ak nie je k dispozícii program na zostrojenie kalibračnej závislosti, použije sa nasledovný postup:

- Vypočítajte priemerné absorbancie pre každý štandard a kontrolné vzorky.
- Nakreslite štandardnú krivku na semilogaritmický papier vynesení logaritmu koncentrácií štandardov ( $\text{U.ml}^{-1}$ ) na horizontálnu os (x) proti priemerným absorbanciám štandardov na vertikálnu os (y). Z krivky odčítajte hodnotu koncentrácií kontrolných a patientskych vzoriek. Táto hodnota sa už nenásobí riediacim faktorom.

### Očakávané hodnoty:

Očakávané hodnoty u zdravej populácie sú negatívne. Avšak aj u asymptomatických, zjavne zdravých osôb môžu byť zvýšené hladiny protilátok IgA proti mannanu ASCA.

### Odporúčame nasledovné hodnotenie výsledkov:

**Negatívne hodnoty** < 17  $\text{U.ml}^{-1}$

**Hraničná hodnota** 17-22  $\text{U.ml}^{-1}$

**Pozitívne hodnoty** > 22  $\text{U.ml}^{-1}$

## 16 Parametre analytického výkonu

Analytická citlivosť :	0,233 U.ml <sup>-1</sup>
Opakovateľnosť (Intra-assay)	6,19 %
Reprodukovateľnosť (Inter-assay)	7,18 %
Presnosť	9,61 %
Hranice rozsahu detekcie	6,25 U.ml <sup>-1</sup> - 100 U.ml <sup>-1</sup>

Súprava je špecifická pre ľudský imunoglobulín triedy IgA

## 17 Odporúčania pri práci so súpravou

Pri spracovaní súpravy odporúčame dbať na dôsledné vykonanie jednotlivých krokov definovaných v pracovnom postupe, ako je správne pipetovaný objem substancií, presné dodržanie inkubačných časov a dôsledné premytie a odsatie vymývacieho roztoku z jamiek v procese premývania. Nesprávne premytie mikrotitračných jamiek, prípadne vynechaný cyklus, či krok premývania, má priamy vplyv na stanovené hodnoty absorbancií.

Pred spracovaním súpravy odporúčame dbať na dobré vytemperovanie substancií a mikrotitračnej doštičky. Zlé vytemperovanie substancií má priamy vplyv na presnosť merania.

Pre prípravu vymývacieho roztoku používajte vysoko kvalitnú destilovanú vodu vhodnú na laboratórne použitie.

Pri spracovaní súpravy dbajte na dodržiavanie správnej laboratórnej praxe. Odporúčame používať jednorazové pipetovacie špičky. Pre pipetovanie každej substancie použite novú špičku pre elimináciu kontaminácie vzoriek a substancií.

Súpravu je možné spracovať postupne. Nepoužitú stripy uchovávať v hliníkovom ochrannom obale spolu s vysúšadlom podľa podmienok skladovania uvedených v tomto návode na použitie. Pre každé spracovanie súpravy odporúčame použiť a nariediť iba potrebné množstvo čerstvých substancií.

Neodporúčame používať už nariadené, alebo inak pripravené substancie, ktoré boli pripravené pre predchádzajúce spracovania (ani v prípade, ak boli uchovávané v chladničke).

Striktne odporúčame používať substancie iba v rámci príslušnej šarže a príslušnej súpravy (nesmú sa miešať substancie medzi rôznymi šaržami).

Odporúčame zabezpečiť, aby substrát TMB nebol vystavený slnečnému žiareniu (prípadne umelému osvetleniu). Vaničku pre pipetovanie TMB roztoku nepoužívajte na iné substancie.

## **Odporúčania pri práci so súpravou v ELISA automatizovaných systémoch**

Pri automatizovanom spracovaní súpravy odporúčame odsledovať časový priebeh jednotlivých krokov spracovania a prípadne nastaviť správne časové intervaly jednotlivých krokov (hlavne po fáze premývania by mala byť hneď pridaná príslušná látka - konjugát HRP, substrát TMB).

Odporúčame skontrolovať správny priebeh každého kroku spracovania - správne premytie, správne pipetovanie objemov, správny čas inkubácie a pod..





















Nastavenie teploty v automatizovanom systéme musí byť zabezpečené tak, aby bolo v súlade s odporúčanou teplotou uvedenou v tomto návode na použitie. Znížená a zvýšená teplota pri spracovaní súpravy má priamy vplyv na stanovené hodnoty absorbančností.

Odporúčame mať počas spracovania súpravy uzatvorený kryt automatu. Vystavenie substrátu TMB svetlu môže mať za následok znehodnotenie látky s priamym negatívnym dopadom na výsledok spracovania.

Súprava je vhodná pre spracovanie na všetkých typoch automatických ELISA analyzátoroch.

Pri nedodržaní pracovného postupu výrobca nezodpovedá za správnu funkciu súpravy.

## 18 Zoznam použitých symbolov

	Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro
	Katalógové číslo
	Šarža / LOT
	Výrobca
	Vhodné pre „n,, testov
	Označenie zhody s regulačnými požiadavkami „CE,,
	Obsahuje ľudské tkanivo
	Obsahuje zvieracie tkanivo
	Chráňte pred slnkom
	Dátum expirácie
	Obmedzenie teploty / Teplotný rozsah
	Prečítajte si návod na použitie / elektronický návod na použitie
	Nepoužívať opakovane
	Varovanie
	Nepoužívať, ak je obal poškodený
	Distribútor
	Vhodíte do príslušnej zbernej nádoby
	Materiálové zloženie HDPE
	Materiálové zloženie PP
	Materiálové zloženie papier a lepenka

## 19 Literatúra

Barta,Z., Csípo,I., Szabó,G.G., Szegedi,G.: Seroreactivity against *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and celiac disease. *World J. Gastroenterol.* 2003, 9,(10), 2308-2312

Hoffman,I.E.A., Demetter,P., Peeters,M., De Vos,M., Mielants,H., Veys,E.M., De Keyser,F.: Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies are raised in ankylosing spondylitis and undifferentiated spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2003, 62, 455-459

Lindberg,E., Magnusson,K.E., Tysk,C., Järnerot,G.: Antibody (IgG, IgA, and IgM) to baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), yeast mannan, gliadin, ovalbumin and betalactoglobulin in monozygotic twins with inflammatory bowel disease. *Gut*, 1992, 33, 909-913

Muratori,P., Muratori,L., Guidi,M., Maccariello,S., Pappas,G., Ferrari,R., Gionchetti,P., Campieri,M., Bianchi,F.B.: Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) and autoimmune liver diseases. *Clin Exp Immunol.* 2003, 132, 473-476

Nevoral,J., Valtrová,V., Kotalová,R., Nyč,O., Bartůňková,J., Tláška,P.: Protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) a protilátky proti cytoplazmě neutrofilních leukocytů (ANCA) u dětí a mladistvých s nespecifickými zánětlivými střevními onemocněními. *Čes.-slov.Pediat.*, 2003,58, 291-293

Šišinka,M., Nyulassy,Š., Badalík,Z. a kol.: *Vademecum medicí 6.* prepracované, aktualizované, doplnené a rozšírené vydanie. Vydavateľstvo Osveta s.r.o. Martin 2003