

**INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub>**

Výrobce: \_\_\_\_\_

**Fujirebio Europe N.V.**  
Technologiepark 6  
9052 Gent  
Belgium  
Tel. +32 9 329 13 29  
BTW BE 0427.550.660  
RPR GentDistribuce v ČR:**ASCO-MED, spol. s r. o**  
Pod Cihelnou 6/ 664  
Praha 6  
Česká republika  
Tel. +42 0 233 313 578  
Fax +42 0 233 313 582  
asco@ascomed.cz[eifu.fujirebio.com/FRE/all/?keycode=FRI91684](http://eifu.fujirebio.com/FRE/all/?keycode=FRI91684)

☎ +800 135 79 135 / +31 20 794 7071









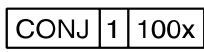
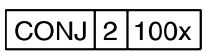




8:00 – 17:00 GMT+1

|   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| M | T | W | T | F | S | S |
| ☒ | ☒ | ☒ | ☒ | ☒ | ☐ | ☐ |

## OBSAH

|   |    |
|---|----|
| Použité symboly: . . . . .                          | 2  |
| Zamýšlené použití: . . . . .                        | 3  |
| Princip testu . . . . .                             | 3  |
| Reagencie . . . . .                                 | 4  |
| Materiál potřebný, ale nedodávaný . . . . .         | 5  |
| Metrologická návaznost přiřazených hodnot . . . . . | 6  |
| Bezpečnost a preventivní opatření. . . . .          | 6  |
| Vzorky – odběr, manipulace a skladování. . . . .    | 8  |
| Pracovní postup . . . . .                           | 9  |
| Kontrola kvality . . . . .                          | 10 |
| Výsledky . . . . .                                  | 10 |
| Parametry testu . . . . .                           | 11 |
| Omezení testovacího postupu. . . . .                | 15 |
| Obchodní značka: . . . . .                          | 15 |
| Literatura . . . . .                                | 15 |

### Použité symboly

|   |   |  |
|---|---|--|
|    | Manufacturer                              | Výrobce  |
|   | <i>In vitro</i> diagnostic medical device | <i>In vitro</i> diagnostický zdravotnický prostředek |
|   | Batch code                                | Šarže  |
|   | Catalogue number                          | Katalogové číslo                                     |
|   | Use-by date                               | Použitelné do data                                   |
|   | Consult instructions for use              | Viz Návod k použití                                  |
|  | Temperature limit                         | Teplotní omezení                                     |
|   | Contains sufficient for <n> tests         | Dostačující pro <n> testů                            |
|   | Conjugate 1 100x                          | Konjugát 1 100x                                      |
|   | Conjugate 2 100x                          | Konjugát 2 100x                                      |
|   | Conjugate diluent 1                       | Diluent konjugátu 1                                  |
|   | Conjugate diluent 2                       | Diluent konjugátu 2                                  |
|   | Microtiter plate                          | Mikrotitrační destička                               |
|   | Sample diluent                            | Diluent vzorku                                       |

|               |                    |                      |
|---------------|--------------------|----------------------|
| STOP SOLN     | Stop solution      | Zastavovací roztok   |
| SUBS TMB 100x | Substrate TMB 100x | Substrát TMB 100x    |
| SUBS BUF      | Substrate buffer   | Substrátový pufr     |
| WASH SOLN 25x | Wash Solution 25x  | Promývací roztok 25x |
| WARNING       | Warning            | Varování             |
| EIA           | Enzyme Immunoassay | Enzymová Imunoassay  |

## Zamýšlené použití

INNOTEST<sup>®</sup>  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub> je enzymoimunoanalytický test na pevné fázi pro kvantitativní stanovení  $\beta$ -amyloidu<sub>1-42</sub> v lidském mozkomíšním moku (cerebrospinal fluid-CSF). Toto stanovení je určeno pro detekci  $\beta$ -amyloidového peptidu A $\beta$ , který je výsledkem  $\beta$ -sekretázové funkce zrání APP (prekurzor proteinu amyloidu) a začíná na 1<sup>ni</sup> aminokyselině (AA) N terminálního konce a končí na pozici 42. Tento protein, hydrofobní a neurotoxický, je hlavní složkou amyloidových depozit.

Kombinace koncentrací markerů CSF  $\beta$ -amyloid<sub>(1-42)</sub> a CSF-Tau umožní rozlišení Alzheimerovy choroby (AD) od běžného stárnutí a ostatních neurodegenerativních onemocnění, jako je deprese (1,2). Výsledek by měl být interpretován jako jeden z diagnostických markerů AD v kombinaci s dalšími klinickými a diagnostickými informacemi (například s výsledky získanými INNOTEST<sup>®</sup> hTau Ag a INNOTEST<sup>®</sup>PHOSPHO-TAU<sub>(181P)</sub>) Rozlišení AD od ostatních non-AD demencí, jako demence s Lewyho tělisky, může být dále zlepšeno kvantifikací CSF- Phospho-Tau<sub>(181)</sub> (3).

## Zamýšlený uživatel

Laboratorní technici nebo výzkumní pracovníci v klinických nebo výzkumných laboratořích s odpovídající laboratorní dovedností a dobře vyškolení v technikách enzymové imunoanalýzy.

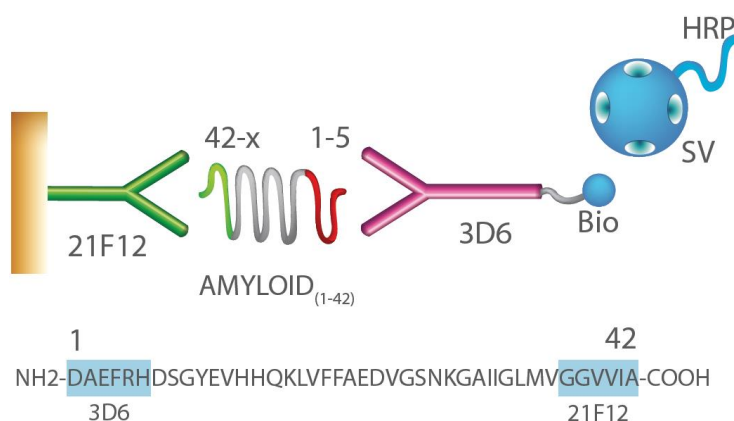
## Pozadí

Nejběžnější formou demence je Alzheimerova choroba, což je neurodegenerativní porucha histologicky charakterizovaná akumulací intracelulárních neurofibrilárních klubek a extracelulární amyloidních plaků v celé kortikální a limbické oblasti mozku. Ultrastruktura neurofibrilárních klubek je vytvořena z párových spirálových vláken složených převážně z abnormálně hyperfosforylovaného Tau proteinu (pTau). Hlavní složky depozit amyloidu jsou amyloidní peptidy dlouhé 40- a 42-  $\beta$ -aminokyselin, které jsou odvozeny z integrálního membránově vázaného amyloidního prekurzorového proteinu (4). Hodnoty pro  $\beta$ -amyloid<sub>1-42</sub> a  $\beta$ -amyloid<sub>1-40</sub> mohou být vyjádřeny jako poměr  $\beta$ -amyloidu, který je zvláště užitečný u pacientů, u kterých je pozorován neurčitý profil biomarkerů CSF (na základě  $\beta$ -amyloidu<sub>1-42</sub>, celkového Tau a pTau<sub>181</sub>) (5, 6, 7). Kombinace snížených koncentrací  $\beta$ -amyloidu<sub>1-42</sub> nebo poměr  $\beta$ -amyloid<sub>1-42</sub>/ $\beta$ -amyloid<sub>1-40</sub> a zvýšené koncentrace celkového Tau a

pTau jsou považovány za patologický biomarker CSF, který je diagnostický pro AD (8). Bylo prokázáno, že nízké koncentrace  $\beta$ -amyloidu 1-42 nebo poměru  $\beta$ -amyloidu 1-42/ $\beta$ -amyloidu 1-40 v CSF předpovídají přechod mírné kognitivní poruchy do AD a paralelní depozice A $\beta$  v mozku (9).

### Princip testu

INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub> je enzymoimunoanalytický test na pevné fázi (EIA), kde amyloidový peptid je navázán první monoklonální protilátkou 21F12 (IgG2a). Po přidání vzorku CSF a biotinylované protilátky 3D6 (IgG2B) probíhá inkubace. Tento komplex antigen-protilátka je potom detekován straptavidinem značenou peroxidázou. Po přidání substrátového roztoku se roztok zabarví. Intenzita zabarvení je úměrná množství lidského  $\beta$ -amyloidového 1-42 proteinu ve vzorku.



Obrázek 1: Schematický přehled principu testu INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub>: s indikovanými epitopy, reagujícími s použitými mABS (SV-streptavidin; HRP-(horseradish)-křenová peroxidáza)

### Reagencie

#### Popis, příprava k použití a doporučené skladovací podmínky

- Při skladování od 2°C do 8°C otevřené nebo neotevřené, skladované v původních lahvičkách jsou všechny reagenty včetně navázaných stripů použitelné do data expirace na balení. Reagenty nezmrazujte. Nepoužívejte reagenty po době expirace. Při správné manipulaci je udržena expirace produktu.
- Po otevření aluminiového sáčku se stripy jsou nepoužité stripy stabilní 16 týdnů při skladování od 2°C do 8°C v uzavřeném plastickém sáčku se silikagelem.
- Ready-to-use kalibrátory (CAL) a validační kontroly běhu (RVC) je třeba skladovat při -20°C, odděleně od ostatních součástí soupravy.
- Zředěný promývací roztok je stabilní 4 týdny při teplotě od 2°C do 8°C
- Pracovní roztok konjugátu 1 a 2 je stabilní 24 hodin při pokoj. teplotě.
- Pracovní roztok substrátu je stabilní 24 hodin při pokojové teplotě v temnu.
- Všechna činidla a testovací proužky by měly být vytemperovány na pokojovou teplotu (18°C až 30°C) přibližně 60 minut před použitím a ihned po použití by měly být vráceny do chladničky (2°C až 8°C), s výjimkou CAL a RVC, protože jsou pouze na jedno použití.

- Změny ve fyzickém vzhledu součástí soupravy mohou naznačovat nestabilitu nebo zhoršení kvality.

| <b><u>Název</u></b>                | <b><u>Množství</u></b> | <b><u>Kat.č.</u></b> | <b><u>Popis</u></b>   |
|------------------------------------|------------------------|----------------------|---|
| Coated plate                       | 1x96                   | 57781                | 1 zatavený sáček obsahující stojánek na stripy s 12x8 coatovanými testovacími jamkami a silikagelovým sáčkem jako vysoušedlem.  |
| Sample diluent                     | 1x 30 ml               | 55706                | Fosfátový pufr se stabilizačními proteiny a 0,01% MIT/0,1% CAA jako konzervantu .   |
| Conjugate 1<br>100x                | 1x0,2 ml               | 57782                | Myší anti- $\beta$ -amyloid <sub>(1-42)</sub> IgG značený biotinem ve fosfátovém pufru se stabilizačními proteiny a 0,04% MIT/0,1% CAA jako konzervantem. Zředit 1/100 Conjugate diluentem 1 před použitím  |
| Conjugate 2<br>100x                | 1x 0,3 ml              | 55528                | Peroxidázou značený streptavidin obsahující 0,02% MIT a 0,02% bromonitrodioxane jako konzervant. Před použitím zředte 1/100 Conjugate diluentem 2 (viz příprava reagensí).  |
| Conjugate<br>diluent 1             | 1x 20 ml               | 61305                | Barevně kódovaný (červený) Fosfátový pufr obsahující stabilizující proteiny a 0,01% MIT/ <0,1% CAA jako konzervant, používá se pro ředění conjugate 1.  |
| Conjugate<br>diluent 2             | 1x 30 ml               | 55825                | Barevně kódovaný (zelený) fosfátový pufr obsahující 0.05% Proclin 300 jako konzervant, hovězí kasein jako stabilizátor a hovězí aprotinin jako inhibitor proteáz, používá se pro ředění conjugate 2.  |
| Substrate TMB<br>100x              | 1x 0,3 ml              | 55733                | Tetramethylbenzidine (TMB) zředěný v dimethylsulfoxidu (DMSO). Před použitím zředit 1/100 substrátovým pufrům. Koncentrovaný TMB může krystalizovat; před použitím by měl být zcela rozpuštěn (teplota tání 18°C).  |
| Substrate buffer                   | 1x 30 ml               | 55727                | Fosfát-citrátový pufr obsahující 0,02% hydrogen peroxide pro ředění substrate TMB.  |
| Stop solution                      | 1x 30 ml               | 55523                | 0.9N kyselina sírová  |
| Wash solution<br>25x               | 1x 60 ml               | 55742                | Fosfátový pufr obsahující 0.01% MIT/<0.1% CAA, který je třeba zředit 25x destilovanou nebo deionizovanou vodou. V koncentrátu mohou být vytvořeny nerozpuštěné krystaly soli při uchování při 2-8°C . Tyto krystaly musí být před použitím zcela rozpuštěny |
| Uncoated<br>polypropylene<br>plate | 1                      | -                    | Pro ředění vzorků před přenosem do coatované destičky (aby se zabránilo změně reaktivity).  |
| Plate sealers                      | 4                      | -                    | -   |
| Minigrip bag                       | 1                      | -                    | Sáček pro skladování nepoužitých stripů.  |

## Materiál potřebný, ale nedodávaný

- Destilovaná nebo neionizovaná voda.
- Jednorázové rukavice.
- Nastavitelné pipety s jednorázovými špičkami pro objemy 10  $\mu$ l 20-200  $\mu$ l a 200–1000  $\mu$ l.
- Doporučujeme multikanálovou pipetu na 25  $\mu$ l, 75  $\mu$ l a 100  $\mu$ l pro přidávání konjugátů, substrátu a zastavovacího roztoku.
- Odměrné válce pro ředění promývacích roztoků (250ml, 500ml, 1000ml nebo 2000ml)
- Vortex nebo obdobný přístroj
- Centrifuga
- Promývačka mikrotestiček; alternativně lze promývání provést pomocí opakující se pipety dodávající objemy 400  $\mu$ l a vakuového odsávacího zařízení, které obsahuje 5% roztok chlornanu sodného.
- Časovač (minutka)
- Absorpční ubrousky
- Reader pro mikrotitrační destičky s filtrem 450  $\pm$  5 nm, je-li dostupný, i s filtrem 620 nm nebo 690 nm pro duální analýzu s minimálním lineárním absorpčním rozsahem 0-3000.
- Jednorázové zkumavky pro přípravu pracovních roztoků (doporučené polypropylene BD Falcon tubes).
- Kontejnery pro biologický potenciálně kontaminovaný materiál
- Třepačka na mikrotitrační destičky (1000 rpm). Protřepání může být zajištěno i poklepáváním na stranu destičky.
- Inkubátor 25 $\pm$ 2°C

## Metrologická návaznost přiřazených hodnot

Kalibrace INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub> je navázána na certifikovanou referenci. materiálů  $\beta$ -amyloidu<sub>1-42</sub> v lidském mozkomíšním moku: ERM-DA480/IFCC, ERM-DA481/IFCC a ERM-DA482/IFCC.

## Upozornění a bezpečnostní opatření

### **Informace o zdraví, bezpečnosti a životním prostředí**

Informace o potenciálně nebezpečných složkách naleznete v bezpečnostním listu (SDS) a na etiketě výrobku. Nejnovější verze bezpečnostního listu je k dispozici na webových stránkách [www.fujirebio.com](http://www.fujirebio.com).

### Varování

|          |   |      |   |      |
|----------|---|------|---|------|
| CONJ DIL | 2 | CONJ | 2 | 100x |
|----------|---|------|---|------|



Obsahuje rekční směs 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC č. 247-500-7] a 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC č. 220-239-6](3:1)

H317 P261 P280 P302+P352 P333+P313 P362+P364

|      |     |      |
|------|-----|------|
| SUBS | TMB | 100x |
|------|-----|------|

Obsahuje dimethyl sulfoxide

H315 H319 H335 P261 P280 P302+P352 P305+P351+P338  
P312 P362+P364

### Bezpečnostní věty:

|        |   |
|--------|---|
| H315   | Způsobuje podráždění kůže.                                  |
| H317   | Může způsobit alergickou kožní reakci.                      |
| H319   | Způsobuje vážné poškození očí.                              |
| H335   | Může způsobit podráždění respiračního traktu.               |
| EUH208 | Obsahuje 2-chloroacetamid. Může způsobit alergickou reakci. |
| EUH210 | Bezpečnostní data jsou na vyžádání.                         |

### Bezpečnostní opatření

|               |  |
|---------------|--|
| P261          | Zabraňte vdechování mlhy / páry / spreje.  |
| P280          | Noste ochranné rukavice / plášť / brýle / obličejovou masku.   |
| P302+352      | NA KŮŽI: Omyjte větším množstvím mýdla a vody.   |
| P305+351+P338 | V OČÍCH: Oplachujte několik minut vodou, Nosíte-li, odstraňte kontaktní čočky, Pokračujte v omývání vodou. |
| P312          | V případě, že se necítíte dobře, volejte lékaře nebo TOXIKOLOGICKÉ STŘEDISKO (viz výše).                   |
| P333+P313     | V případě, že se objeví na kůži podráždění, vyhledejte lékaře.   |
| P362 + P364   | Odstraňte kontaminovaný oděv a před dalším použitím ho vyperte.  |

- Provádět testování by měla vždy pouze adekvátně školená osoba.
- Se vzorky je třeba vždy zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem. Všechny biologický materiál je třeba likvidovat v souladu s nařízenými bezpečnostními předpisy.

POZNÁMKA: Zvláštní upozornění pro Transmisivní Spongyformní Encefalopatii (TSE)/ materiály kontaminované priony:

- Inaktivace vzorku:  
Klinické vzorky (CSF) by měly být autoklávovány alespoň 15 min při 134°C nebo ponořeny do roztoku chlornanu sodného obsahujícího 20000 ppm volného chloru 1 hodinu před konečnou likvidací zdravotnického materiálu (tj před spálením nebo autoklávováním).
- Likvidace odpadu  
Veškerý materiál klasifikovaný jako klinický odpad by měl být spálen pověřenou společností pro likvidaci biologického odpadu. Používejte bezpečné kontejnery pro klinický odpad (dvojité pytle, ...). Zabraňte vnější kontaminaci kontejneru.

- Odkazy:
  - Výbor pro nebezpečné patogeny (UK) – Výbor pro Spongyformní Encefalopatii: Agens Transmisivní Spongyformní Encefalopatie: Bezpečná práce a prevence infekce
  - WHO Světová zdravotnická organizace: WHO nařízení pro Transmisivní Spongyformní Encefalopatii.
- Používejte ochranné vybavení: noste laboratorní plášť, rukavice, ochranné brýle, pokud pracujete s nebezpečným nebo infekčním materiálem.
- Zlikvidujte všechna použitá nebo zbytková činidla a další kontaminované materiály k likvidaci v souladu s pokyny instituce pro likvidaci odpadu. Je odpovědností každé laboratoře nakládat s pevnými a kapalnými odpady podle jejich povahy a stupně nebezpečnosti a zacházet s nimi a likvidovat je v souladu se všemi platnými mezinárodními, národními a místními předpisy.
- V případě vážného incidentu kontaktujte do 24 hodin Fujirebio Europe N.V. a regulační úřad příslušné země.

### **Analytická opatření**

- Následující reagenty jsou generické (stejně složení) pro všechny soupravy INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID a TAU: diluent vzorku (sample diluent), substrát, substrát. pufr, promývací roztok (wash solution) stop solution. Pro zajištění správné výsledovatelnosti se doporučuje používat reagenty z jedné soupravy a zaznamenat šarži každé použité komponenty.
- Nezaměňujte reagenty různých šarží souprav INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID. pokud nemají reagenty shodné číslo šarže.
- Nepoužívejte opakovaně jednorázový materiál.
- Doporučují se špičky pipet s vatovými zátkami. Používejte pouze jednorázové laboratorní materiály
- Pro každý alikvot používejte novou pipetu
- Všechny nádoby použité pro přípravu pracovních roztoků konjugátu a substrátu musí být perfektně čisté, omyté destilovanou vodou.
- Odložte stranou ELISA destičky, aby se zabránilo kontaminaci jamek.
- Zamezte mikrobiální kontaminaci reagenty.
- Pro zajištění homogenity vzorků, CAL a RVC vortexujte před použitím 10 s.
- Pro každý vzorek použijte novou špičku.
- Ujistěte se, že je v jamce vzorek.
- Odstraňte bubliny poklepaním na stranu destičky nebo na třepače pro mikrotitrační destičky 1 min při 1000 rpm.
- Nevystavujte pracovní roztok substrátu silnému světlu během skladování nebo inkubace. Pokud není substrátový roztok bezbarvý, je třeba jej připravit znovu
- Stop solution, pracovní roztoky konjugátů nebo substrátu nesmí být v kontaktu s kovy nebo ionty kovů, aby se zabránilo nechtěné barevné reakci.
- Pokud nemohou být jamky naplněny pracovním roztokem konjugátu nebo substrátu ihned po promytí, umístěte destičku dnem vzhůru na ubrousek nasáklý promývacím roztokem, ale ne déle než 15 min.
- Nepoužívejte zkumavky pro odběr krve na přípravu pracovních roztoků reagenty.



## Vzorky: odběr, manipulace a skladování

Správná manipulace se vzorky je klíčová pro získávání správných výsledků (10). Používejte pouze **polypropylenové** zkumavky. Jsou doporučované z důvodů standardizace všech kroků manipulace se vzorky, aby výsledky byly reprodukovatelné. Stanovení není validované pro post-mortem CSF, ventrikulární CSF, krevní vzorky (sérum, plazma), mozkovou tkáň nebo buněčné kultury v supernatantu.

### CSF vzorky – odběr (11):

- Lumbální punkce by měla být prováděna raději ráno.
- Lumbální punkce by měla být prováděna L3/L4 nebo L4/L5.
- Prvních 20 kapek odstraňte, potom odeberte ca CSF do **polypropylenové** zkumavky (12, 13).
- Zamezte příliš velkému volnému prostoru ve zkumavce).
- Vzorek by měl být zpracován nejlépe během 4 hodin po lumbální punkci.

### Zpracování CSF (14, 15)

- Vylučte hemorhagické CSF vzorky.
- Centrifugujte CSF 10 min při  $\pm 2000$  g při kontrolované pokojové teplotě, aby se odstranily buňky a nerozpustné podíly.
- Rozdělte alikvoty do polypropylenových zkumavek.
- Zamezte příliš velkému volnému prostoru ve zkumavce (16); ideálně 400  $\mu$ l CSF do 500  $\mu$ l zkumavky.
- S alikvoty manipulujte podle transportních doporučení.

### Transport do vzdálené laboratoře (15, 17)

- **Nezmrzlý:** odešlete vzorky do 48 hodin při pokojové teplotě.
- **Zmrzlý:** Odešlete vzorky na suchém ledu, zabraňte rozmrznutí.

### Skladování alikvotů CSF:

- Čerstvé vzorky skladujte maximálně 48 hodin při pokojové teplotě do doby testování
- Nejlépe skladujte při  $-80^{\circ}\text{C}$  do doby testování (18)
- Vzorky mohou být skladovány 2 měsíce při  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Zabraňte rozmrznutí vzorku, opakované zmrazování způsobí chybné výsledky koncentrace (14, 15, 16, 17, 18, 19).

## Pokyny pro promývání

Poznámka: Prosím následujte pokyny na manipulaci s odpady popsány v odstavci „*Informace o zdraví, bezpečnosti a životním prostředí*“

Pro automatické promývačky doporučujeme následující protokol:

Promyjte promývačku zředěným promývacím roztokem.

Provedte 5 promývacích cyklů:

- Plnicí objem je 400  $\mu$ l/ jamku.
- Výška ředění je nastavená tak aby zcela naplnila jamku.
- Čas pro jedno promytí (odsátí/promytí/naplnění) je ca 30 s.
- Po promytí destičku otočte a poklepáním osušte na absorpční ubrousek.

Manuální postup je následující:

1. Odstraňte kryt destičky.
2. Odstraňte roztok a otočte destičku, oklepejte na absorpční ubrousek.
3. Do každé jamky přidejte 400  $\mu$ l promývacího roztoku alespoň 30 vteřin
4. Poté promývací roztok odstraňte. Destičku otočte a poklepáním osušte na absorpční ubrousek.
5. 4x opakujte kroky 3) a 4).

Neúplné promytí ovlivní výsledky testu. Kontaminace promývacího roztoku a promývačky způsobí velké problémy. V případě, že máte podezření na kontaminaci, dezinfikujte lahve promývačky a promývačku přes noc vhodným dezinfekčním prostředkem a promyjte vodou.

### **Příprava reagensů:**

*příprava pracovního roztoku konjugátu 1 a 2 a pracovního roztoku substrátu*

| Počet jamek |         | 8   | 16  | 32 | 64 | 96  |
|-------------|---------|-----|-----|----|----|-----|
| CONJ 1      | $\mu$ l | 10  | 15  | 30 | 60 | 100 |
| CONJ DIL 1  | ml      | 1   | 1,5 | 3  | 6  | 10  |
| CONJ 2      | $\mu$ l | 12  | 20  | 40 | 80 | 120 |
| CONJ DIL 2  | ml      | 1,2 | 2   | 4  | 8  | 12  |
| SUBS        | $\mu$ l | 12  | 20  | 40 | 80 | 120 |
| SUBS BUF    | ml      | 1,2 | 2   | 4  | 8  | 12  |

### **Příprava promývacího roztoku:**

(Připravte alespoň 40 ml zředěného promývacího roztoku pro každý testovaný strip.)

| Počet jamek      |    | 8   | 16  | 32  | 64  | 96   |
|------------------|----|-----|-----|-----|-----|------|
| WASH SOLN 25x    | ml | 5   | 10  | 20  | 40  | 60   |
| H <sub>2</sub> O | ml | 120 | 240 | 480 | 960 | 1440 |

## Pracovní postup

Před prováděním testu přečtěte prosím odstavec "Analytická opatření".

### POZNÁMKA:

- Stanovte velikost série a počet potřebných jamek (v dubletech). Započítejte 6 kalibrátorů, 2 RVC-kontroly, CSF vzorky.
  - Vzhledem k tomu, že inkubace trvá 60 min, omezte dobu ředění na minimum. Aby se zredukovalo zpoždění reaktivity, byla přidána do kitu necoatovaná polypropylenová destička jako „čekací stanice“. Doporučujeme použít tuto destičku, pokud je potřeba více než 6 stripů. Zředte  $\geq 60 \mu\text{l}$  vzorku/CAL, RVC do jamek v přípravné destičce. Vzorky i kontroly by měly být před přidáním promíchány na vortexu.
  - Vytemperujte na laboratorní teplotu všechny reagentie včetně aluminiového sáčku s coatovanými stripy ca 60 minut před použitím a ihned po použití vraťte do chladu. Aby se zabránilo kondenzaci vody v jamkách, musí být aluminiový sáček uzavřený, dokud nedosáhne laboratorní teploty.
  - Vytemperujte na laboratorní teplotu (18-30°C) CAL, RVC a CSF vzorky ca 60 min před použitím.
  - Před započítáním testování se přesvědčte, že CAL, RVC a CSF vzorky jsou připraveny. Jakmile testování započne, musí být provedeno bez přerušování, aby bylo dosaženo spolehlivých a konzistentních výsledků.
  - CSF vzorky, CAL a RVC před testováním 10 vteřin vortexujte.
1. Vezměte rámeček s potřebným počtem stripů pro každou sérii testů. Ostatní nepoužívané stripy umístěte do plastického uzavíratelného sáčku se silikagelem.
  2. Připravte pracovní roztok konjugátu 1.podle bodu „Příprava reagentií“
  3. Do každé testovací jamky přidejte 75  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku konjugátu 1.
    - a. *V případě, kdy se testuje pouze malý počet vzorků:*  
Přidejte 25  $\mu\text{l}$  příslušného vzorku nebo standardu. Vzorky CSF by měly být před přidáním promíchány na vortexu.
    - b. *V případě, kdy se testuje velký počet vzorků (více než 6 stripů):*  
Za použití multikanálové pipety přeneste 25  $\mu\text{l}$  z každé jamky polypropylenové destičky do odpovídajících jamek testovací destičky.
- DOPORUČENÍ: Každý vzorek, kontrolu a kalibrátor těsně před pipetováním do destičky promíchejte 3 s na vortexu.
4. Vzorek a standardy v jamkách dobře promíchejte poklepáváním destičkou nebo třepáním 1 min při 1000 rpm. Přikryjte stripy přílnavou folií a inkubujte 60 min  $\pm$  3min v inkubátoru při 25  $\pm$  2°C.
  5. Ještě před koncem kroku 5 připravte podle návodu pracovní roztok konjugátu 2.
  6. Každou jamku 5x promyjte (viz „Pokyny pro promývání“).
  7. Do každé jamky přidejte 100  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku konjugátu 2. Přikryjte stripy novou přílnavou folií a inkubujte 30 min  $\pm$  3 min v inkubátoru při 25  $\pm$  2°C.
  8. Během inkubace konjugátu 2 připravte pracovní roztok substrátu viz „Příprava reagentií“).

9. Každou jamku 5x promyjte (viz „Pokyny pro promývání“).
10. Do každé jamky přidejte 100  $\mu$ l pracovního roztoku substrátu. Přikryjte stripy příslušnou fólií a inkubujte v temnu 30 min  $\pm$  3min v inkubátoru při 25  $\pm$  2°C. Poklepejte destičkou, abyste zajistili úplné promíchání.
11. Pro zastavení reakce přidejte 50  $\mu$ l stop solution (zastavovacího roztoku) do každé jamky ve stejném pořadí a se stejným časovým intervalem jako substrátový roztok. Opatrně poklepejte destičkou, abyste zajistili úplné promíchání.
12. Do 15 min po kroku 12 odečtěte absorbanci roztoku v jamkách při 450 nm. Pro duální analýzu je možno použít jako referenční filtr o vlnové délce 620 nebo 690 nm.

## Kontrola kvality

### Interní kontrola

Akreditovaná laboratoř by měla zařadit vnitřní kontrolu v každé sérii. Prosím používejte aplikovatelný standard kvality ve vaší laboratoři.

## Výsledky

### Validace běhu

- Absorbance při 450 nm CAL6 by měla být nižší než 0,300.
- Absorbance při 450 nm CAL1 by měla být vyšší než 1,700.
- RVC by měla být uvnitř definovaného koncentračního rozmezí definovaného na nálepce  $A\beta_{(1-42)}$  CAL-RVC soupravy.

### POZNÁMKA:

- Hodnoty absorbancí pro duální vlnovou analýzu (450 nm a 620 nebo 690 nm) se liší o ca 50 mOD oproti neduální. To by nemělo ovlivnit konečný výsledek testu.
- RVC koncentrace na vložené cedulce jsou stanoveny pomocí sestrojené sigmoidální 4-parametrové (nevážené) křivky.

## Výpočet výsledků

Spočítejte průměrné hodnoty absorbancí z duplikátů.

$$\left( \left( \text{abs}(V_1 - V_2) \right) / \left( (V_1 + V_2) / 2 \right) \right) * 100$$

Jestliže se hodnoty liší o více než 20 %, opakujte test

Na milimetrovém papíře sestrojte kalibrační křivku grafickým znázorněním průměrných hodnot standardů  $\beta$ -amyloidu <sub>(1-42)</sub> na svislou osu (Y) proti odpovídajícím hodnotám  $\beta$ -amyloidu <sub>(1-42)</sub> na vodorovné ose (X). Body ved'te křivku.

POZNÁMKA: Doporučuje se sigmoidální 4 parametrová (nevážená) křivka.

Pokud se používá v sérii blank, neměl by být součástí křivky.

Naměřené průměrné absorbance vzorků naneste do grafu a ze standardní křivky odečtěte odpovídající hodnoty  $\beta$ -amyloidu <sub>(1-42)</sub> v pg/ml.

Pokud se při testování zjistí, že absorbance vzorku je mimo limity křivky, tj, OD  $\beta$ -amyloidu <sub>(1-42)</sub> ve vzorku je vyšší než nejvyšší bod křivky, nebo nižší než nejnižší bod křivky, není možné výsledek interpretovat, neboť by to mohlo vést k chybnému výsledku.

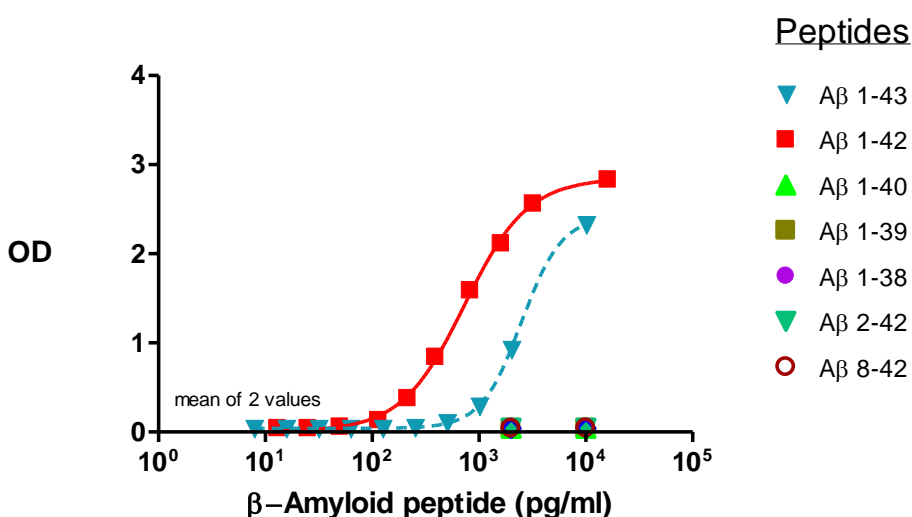
## Parametry testu

### Analytická charakteristika

#### Analytická specifická

Epitop mapující N terminální specifický mAb 3D6 proti peptidu  $A\beta_{42}$  byl stanoven sandwichovou immunoassayí za použití biotinylovaného 21F12 jako detekční protilátky. Pokud byla 3D6 protilátka inkubována s  $A\beta$  peptidy s blokováním N koncem (acetylací) nebo s  $A\beta$  peptidy s myší sekvencí (modifikovaný na pozicích 5, 10, 13), nebyla zjištěna žádná aktivita. 3D6 nerozpoznává rozpustné amyloidové prekurzorové proteiny nebo plnou délku  $\beta$ -APP (19).

Protilátková specifita kombinovaného použití 21F12 a 3D6 byla dále potvrzena za použití různých syntetických lidských  $A\beta$  peptidů a krysích  $A\beta_{(1-42)}$ . 21F12/3D6 ELISA je vysoce specifická pro amyloidové peptidy začínající na aminokyselině 1 a končící na karboxy-terminálním konci u aminokyseliny 42 nebo 43. 40x vyšší afinita byla zjištěna pro  $A\beta_{1-42}$  oproti  $A\beta_{1-43}$ . Nebyla zjištěna zkřížená reaktivita s  $A\beta_{1-39}$ ,  $A\beta_{1-40}$ ,  $A\beta_{2-42}$ ,  $A\beta_{8-42}$ .



Obrázek 2: Specifita coatované destičky vůči různým  $A\beta$  peptidům

#### Analytická senzitivita

Slepý vzorek = (sample diluent) byl testován 28x v různých sériích za účelem zjištění limitu detekce (LoD). Průměr + 2 Standardní odchylky (SD) blanku byly kalkulovány a postupně konvertovány obrácenou sigmoidální relací na koncentraci. Získaná hodnota LoD byla 65 pg/ml.

#### Rozsah testu

Rozsah testu je limitován dolním (Lower Limit of Quantification (LLOQ)) a horním (Upper Limit of Quantification (ULOQ)) limitem testu, který je definován jako bod, kdy přesnost a očekávaný bias nepřesáhne 20%.

Bylo testováno celkem 15 CSFG vzorků a 2 RVC dvěma laboranty v různé dny v duplikátech (2 hodnoty).

Získaný rozsah stanovení za použití této sady testů je:

(LLOQ) 225 pg/ml (CSF s nejnižší koncentrací) až  
 (ULOQ) 1452 pg/ml (RVC1 –vzorek s nejvyšší koncentrací).

### Správnost

Dostupné certifikované referenční materiály pro  $A\beta_{1-42}$  (CRMs ERM-DA480/IFCC, ERM DA481/IFCC a ERM-DA482/IFCC) byly analyzovány pomocí INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub>.

Pozorované rozdíly mezi certifikovanou hodnotou a výsledkem měření byly pokryty kombinovanými standardními nejistotami měření INNOTEST a certifikované hodnoty, což znamená, že výsledek INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub> je považován za nezkrácený.

### Přesnost

Byla stanovena přesnost stanovení (intra-assay a inter-assay variabilita).

Bylo testováno 16 CSF vzorků, 2RVC, 6RTU kalibrátory. Testováno 2 laboranty v různých dnech v dubletech (2 hodnoty). Přesnost CSF vzorků a vzorky RVC jsou v tabulce. 1:

Tab. 1: Přehled přesnosti ve vzorcích CSF a RVC

|                       | CSF<br>(n=15*)                | RVC 1<br>(vysoká koncentrace) | RVC 2<br>(nízká koncentrace) |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Intra-assay variation | 4,6%<br>(rozsah 0,8% - 11,0%) | 4,7%<br>(rozsah 3,0% - 6,6%)  | 2,5%<br>(rozsah 1,0%- 4,9%)  |
| Inter-assay variation | 7,8%<br>(rozsah 1,4% - 18,0%) | 3,8%<br>n.a.                  | 4,3%<br>n.a.                 |

\* Jeden vzorek byl vyloučen, neboť to byl slepý vzorek.

### Interferující substance

Experimenty bylo zjištěno, že v používaných experimentálních podmínkách nejsou interference s heparinem, EDTA, hemoglobinem, globuliny, vitamínem C, albuminem nebo bilirubinem (19).

Nejsou očekávané interference s následujícími terapeutickými agens:

Acetaminophen, Acetylsalicylic Acid, Ampicillin, Ascorbic Acid, Biotin, Caffeine, Chloramphenicol, Digoxin, Hydrochlorothiazide, Metoprolol, Theophylline, Warfarin, Donepezil, Rivastigmine, Galantamine, Memantine, Aripiprazole, and Quetiapine.

### Hookův efekt vysokých koncentrací

V testu INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub> nebyl pozorován žádný Hookův efekt při vysoké velmi vysoké úrovni koncentrace analytu (vyhodnoceno při přibližně 4násobku koncentrace CAL 1)

### Referenční interval

Externí studie (20), prováděná na soupravách INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub> a INNOTEST hTAU Ag, stanovila referenční interval na souboru 231 neurologicky a psychiatricky zdravých jedinců.

Byly stanoveny následující referenční hodnoty (průměr  $\pm$  SD), vztahující se k věku:

| <u>Věk (roky)</u><br><u>(pg/ml)</u> | <u>CSF A<math>\beta</math><sub>(1-42)</sub></u> | POZNÁMKA: Je důrazně doporučováno, aby si každá laboratoř ujasnila akceptovatelnost přenosu referenčních údajů, získaných v jiné laboratoři. Referenční intervaly uvedené v tabulce by měly sloužit jako pomocné hodnoty pro in house-validaci. |
|-------------------------------------|---|---|
| 21-51                               | 792 $\pm$ 182                                   |   |
| 51-70                               | 790 $\pm$ 228                                   |   |
| >71                                 | 797 $\pm$ 230                                   |   |

### *Klinické výsledky*

Externí validační studie vedené v osmi evropských a na dvou amerických univerzitách se zabývaly výzkumem CSF. CSF hladiny  $\beta$ -amyloidu<sub>(1-42)</sub> a TAU proteinu byly stanoveny v CSF vzorcích uchovávaných pro účel výzkumu:

150 AD pacientů (AD),

79 pacientů s non-AD demencí (NAD)

84 pacientů s jinými neurologickými onemocněními (ND)

100 zdravých dobrovolníků bez patologických projevů na mozku (CON).

$\beta$ -amyloid<sub>(1-42)</sub> byl kvantifikován pomocí soupravy INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub>, koncentrace TAU proteinu byla měřena soupravou INNOTEST hTAU Ag.

Mediány hladiny  $\beta$ -amyloidu<sub>(1-42)</sub> byly signifikantně nižší u AD (487 pg/ml) než u CON (849 pg/ml;  $p=0,001$ ), ND (643 pg/ml;  $p=0,001$ ), a NAD (603 pg/ml;  $p=0,001$ ).

Rozlišení AD od CON a ND bylo signifikantně zvýšeno kombinací stanovení  $\beta$ -amyloidu<sub>(1-42)</sub> a TAU proteinu (rozlišovací linie: A $\beta$ <sub>42</sub>=240 + 1,18 TAU).

85% senzitivita a 86% specifita při kombinovaném testování

(95% CI [81%, 91%]),

oproti

55% (95% CI [47%, 62%]) pro  $\beta$ -amyloid<sub>(1-42)</sub> samostatně

a

65% (95% CI [58%, 72%]) pro TAU protein samostatně.

Kombinovaný test pro NAD vykazoval 85% senzitivitu a 58% specifitu (95% CI [47%, 69%]).

Klinické hodnoty pro  $\beta$ -amyloid<sub>(1-42)</sub>, TAU protein a CSF-phospho-TAU<sub>(181)</sub> byly demonstrovány v případech autopsií potvrzených demencí.

Byly dosaženy senzitivity, specifity a hodnoty diagnostické přesnosti stabilně přesahující 80% (11).

V souhrnu kombinované stanovení koncentrace  $\beta$ -amyloidu<sub>(1-42)</sub> a TAU proteinu odpovídá požadavkům stanoveným dokumentem *Consensus guidelines for discriminating AD from normal aging and specific neurological disorders such as depression*: Užitečný biomarker by měl vykazovat senzitivitu a specifitu vyšší než 80% (12).

### **Omezení testovacího postupu.**

INNOTEST  $\beta$ -AMYLOID<sub>(1-42)</sub> testovací postup byl vypracován pro kvantifikaci  $\beta$ -amyloidu<sub>1-42</sub> v lidském mozkomíšním moku (CSF), nebyla získána data pro interpretaci výsledků v jiných tělních tekutinách nebo tkáňových vzorcích mozku. Proto nedoporučujeme testovat jiné vzorky, než je v tomto testovacím protokolu uvedeno.

Další možné využití pro monitorování léčebné terapie je závislé na typu terapie; ta by mohla interferovat s testem (např. protilátkové léčebné postupy).

### Obchodní značka

- **INNOTEST** je celosvětově registrovaná obchodní značka firmy Fujirebio Europe N.V., registrovaná v US a dalších zemích.
- **BD Falcon** je obchodní značka Corning Incorporated.

### Literatura

1. Hulstaert F, et al. Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology*, 1999;52(8):1555-1562.
2. Andreasen N, et al. Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol*, 2001;58(3):373-379.
3. Vanderstichele H, et al. Analytical performance and clinical utility of the INNOTEST PHOSPHO-TAU(181P) assay for discrimination between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Clin Chem Lab Med*, 2006;44(12):1472-1480.
4. Lewczuk P, et al. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers for neurodegenerative dementias: An update of the Consensus of the Task Force on Biological Markers in Psychiatry of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry. *World J Biol Psychiatry*, 2018;19(4):244-328.
5. Slaets S, et al. Cerebrospinal fluid A $\beta$ 1-40 improves differential dementia diagnosis in patients with intermediate P-tau181P levels. *J Alzheimers Dis*, 2013;36(4):759-767.
6. Dumurgier J, et al. Cerebrospinal fluid amyloid- $\beta$  42/40 ratio in clinical setting of memory centers: a multicentric study. *Alzheimers Res Ther*, 2015;7(1):30.
7. Sutphen CL, et al. Longitudinal cerebrospinal fluid biomarker changes in preclinical Alzheimer disease during middle age. *JAMA Neurol*, 2015;72(9):1029-1042.
8. Olsson B, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 2016;15(7):673-684.
9. Hansson O, et al. Advantages and disadvantages of the use of the CSF Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) 42/40 ratio in the diagnosis of Alzheimer's Disease. *Alzheimers Res Ther*, 11: 34, 2019.
10. Hansson O, et al. The impact of preanalytical variables on measuring cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis: A review. *Alzheimers Dement*, 2018;14(10):1313-1333.
11. Hampel H, et al. State-of-the-art of lumbar puncture and its place in the journey of patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2021 May 27.
12. Perret-Liaudet A, et al. Cerebrospinal Fluid Collection Tubes: A Critical Issue for Alzheimer Disease Diagnosis. *Clin Chem*, 2012;58(4):787-789.
13. Perret-Liaudet A, et al. Risk of Alzheimer's disease biological misdiagnosis linked to cerebrospinal collection tubes. *J Alzheimers Dis*, 2012;31(1):13-20.



14. Schoonenboom N, et al. Effects of processing and storage conditions on amyloid beta(1-42) and tau concentrations in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice. *Clin Chem*, 2005;51(1):189-195.
15. Zimmermann R, et al. Preanalytical sample handling and sample stability testing for the neurochemical dementia diagnostics. *J Alzheimers Dis*, 2011;25(4):739-745.
16. Leitão MJ, et al. Chasing the effects of pre-analytical confounders – a multicenter study on CSF-AD biomarkers. *Front Neurol*, 2015;6:153.
17. Le Bastard N, et al. Importance and impact of pre-analytical variables on Alzheimer disease biomarker concentrations in cerebrospinal fluid. *Clin Chem*, 2015;61(5):734-743.
18. Schipke CG, et al. Long-term stability of Alzheimer's disease biomarker proteins in cerebrospinal fluid. *J Alzheimers Dis*, 2011;26(2):255-262.
19. Vanderstichele H, et al. Standardization of measurement of  $\beta$ -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid*, 2000;7(4):245-258.
20. Sjögren M, et al. Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values. *Clin Chem*, 2001;47(10):1776-1781.
21. Engelborghs S, et al. Diagnostic performance of a CSF- biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *Neurobiol Aging*, 2008;29(8):1143-1159.
22. Consensus report of the working group on: "Molecular and biochemical markers of Alzheimer's disease". The Ronald and Nancy Reagan research institute of the Alzheimer's association and the national institute on aging working group. No authors listed. *Neurobiol Aging*, 1998;19(2):109-116.