

## Reagents

Para uso diagnóstico *In Vitro*

---

### Uso previsto

---

El QUANTA Flash DGP IgG es un inmunoensayo por quimioluminiscencia (CIA) para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgG anti-DGP (péptido de gliadina desamidado) en suero humano. La presencia de anticuerpos IgG anti-DGP, junto con datos clínicos y otras pruebas de laboratorio, puede ayudar a diagnosticar la celiaquía tanto en pacientes con suficiente IgA como en pacientes con deficiencia de IgA, así como la dermatitis herpetiforme.

### Resumen y explicación de la prueba

---

La celiaquía es una enteropatía por sensibilidad al gluten caracterizada por la inflamación y un típico aplanamiento histológico de la mucosa intestinal, que provoca un síndrome de malabsorción. La etiología exacta de la celiaquía es aún desconocida, pero la gliadina (la fracción soluble en alcohol del gluten del trigo) es claramente el agente tóxico.<sup>1,2</sup>

Originalmente, se utilizaban múltiples biopsias intestinales para diagnosticar la enfermedad celíaca y los trastornos relacionados. Más recientemente, la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN)<sup>3</sup> y varios estudios publicados<sup>4-6</sup> han recomendado el uso de marcadores serológicos, como los anticuerpos anti-gliadina, anti-DGP y anti-endomisio (EMA), con el fin de reducir el número de biopsias intestinales necesarias para realizar un diagnóstico.

Recientes investigaciones han revelado que los anticuerpos de los pacientes celíacos se unen a un número muy pequeño de epítomos específicos de la molécula de gliadina que se han desamidado de forma selectiva.<sup>7-9</sup> Se considera que la desamidación está provocada por la enzima asociada a la enfermedad celíaca, la transglutaminasa tisular.<sup>10</sup> A partir de las anteriores observaciones, se han desarrollado análisis que utilizan péptidos de gliadina desamidados específicos. Estos ensayos consiguen una mayor exactitud en el diagnóstico de la enfermedad celíaca que los análisis de anti-gliadina habituales.<sup>5,11-14</sup>

Una estrategia analítica sensible para detectar personas con enfermedad celíaca en poblaciones de riesgo comprende la determinación de anticuerpos IgG e IgA contra péptidos de gliadina desamidados, ya que una proporción considerable de los pacientes celíacos presentan deficiencia de IgA.<sup>12</sup> Varios estudios han demostrado la elevada utilidad clínica de esta estrategia de análisis.<sup>15,11-14</sup>

La dermatitis herpetiforme (DH) es una enfermedad crónica que causa la aparición de ampollas en la piel. La mayoría de los pacientes con DH presentan una sensibilidad al gluten y una atrofia de las vellosidades yeyunales idéntica a la de los celíacos, y una dieta estricta sin gluten mejora tanto las lesiones intestinales como las cutáneas.<sup>16,17</sup> Sin embargo, un estudio ha revelado que los anticuerpos anti-DGP son más habituales que los anticuerpos anti-tTG en los pacientes con DH.<sup>18</sup>

El QUANTA Flash DGP IgG es una prueba que ofrece un rendimiento mejorado para la detección de anticuerpos IgG contra un péptido sintético desamidado selectivamente, derivado de la proteína del trigo gliadina, y que permite la detección de la enfermedad celíaca incluso si coexiste una deficiencia de IgA.

### Principios del procedimiento

---

Se recubren con péptido de gliadina desamidado sintético partículas de látex paramagnéticas que se guardan en el cartucho de reactivos en unas condiciones que mantienen el antígeno en su estado reactivo. Cuando el cartucho del ensayo está preparado para el primer uso, se invierte varias veces para mezclar completamente los reactivos. A continuación, se coloca el cartucho de reactivos en el instrumento BIO-FLASH<sup>®</sup>.

Mediante el instrumento se diluye en un factor de 1:17 una muestra de suero del paciente con líquido de lavado del sistema añadido a una cubeta desechable de plástico. Se combinan en una segunda cubeta y se mezclan pequeñas cantidades del suero de paciente diluido, las partículas de DGP y el tampón de análisis. Esta cubeta se incuba a 37 °C y, después, las partículas se magnetizan y se lavan varias veces. A continuación, el anticuerpo conjugado con isoluminol se añade a la cubeta y se incuba a 37 °C. De nuevo, las partículas se magnetizan y se lavan repetidamente. El conjugado de isoluminol produce una reacción luminiscente cuando se añaden a la cubeta los reactivos “iniciadores”. La luz generada por la reacción se mide como unidades relativas de luz (RLU) mediante el sistema óptico del BIO-FLASH. El número de RLU es proporcional a la cantidad de conjugado de isoluminol ligado, que a su vez es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-DGP unidos al DGP de las partículas.

El ensayo QUANTA Flash DGP IgG utiliza una curva maestra predefinida específica para cada lote que se carga en el instrumento mediante el código de barras del cartucho de reactivos. A partir de los resultados obtenidos mediante el análisis de dos calibradores se genera una curva de trabajo específica para el instrumento, que el software utiliza para calcular las unidades de quimioluminiscencia (CU) basándose en el valor de RLU obtenido para cada muestra.

## Reactivos

---

1. El cartucho de reactivos del QUANTA Flash IgG contiene los siguientes reactivos para 50 determinaciones:
  - a. Partículas paramagnéticas recubiertas de DGP en tampón con estabilizantes de proteínas y conservante.
  - b. Tampón del ensayo, de color rosa, que contiene solución salina tamponada con Tris, Tween 20, estabilizantes de proteínas y conservantes.
  - c. IgG trazadora: anticuerpos anti-IgG humana etiquetados con isoluminol en tampón con estabilizantes de proteínas y conservante.

## Advertencias

---

1. El tampón del ensayo contiene una sustancia química (cloranfenicol al 0,02%) que está clasificada como cancerígena por el Estado de California.
2. Se utiliza azida sódica como conservante. La azida sódica es una sustancia venenosa que puede resultar tóxica si se ingiere o si se absorbe a través de la piel o los ojos. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si utiliza pilas de lavado para eliminar los reactivos, aclare con abundante cantidad de agua para evitar la formación de azidas metálicas.
3. Utilice un equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
4. Los derrames de reactivos deben limpiarse inmediatamente. Cumpla todas las normas estatales y locales sobre protección del medio ambiente cuando elimine residuos.

## Precauciones

---

1. Este producto está destinado a uso diagnóstico *In Vitro*.
2. Este ensayo solo debe utilizarse en el instrumento BIO-FLASH.
3. Una vez abierto, el cartucho de reactivos debe almacenarse en el carrusel de reactivos del instrumento. La colocación por primera vez del cartucho de reactivos en el instrumento debe realizarse con todo cuidado para no derramar reactivos.
4. Puede producirse contaminación química de los reactivos como consecuencia de un lavado o un aclarado inadecuados del instrumento. Los restos de sustancias químicas habituales en los laboratorios, como formol, lejía, etanol o detergente, pueden interferir en el análisis. Limpie siempre el instrumento siguiendo las recomendaciones indicadas en el manual del operador del BIO-FLASH.

## **Condiciones de conservación**

---

1. Guarde los cartuchos de reactivos no abiertos a 2-8 °C. No los congele. Los reactivos permanecen estables hasta la fecha de caducidad si se almacenan y se manipulan tal como está indicado.
2. Los cartuchos de reactivos abiertos deben guardarse cargados en el instrumento. El software BIO-FLASH supervisa la fecha de caducidad del cartucho cargado (en uso) y la del lote de reactivo (periodo de validez) del cartucho de reactivos. El sistema no permitirá utilizar cartuchos que hayan caducado.

## **Recogida, preparación y manejo de las muestras**

---

Este procedimiento debe realizarse con una muestra de suero. No deben utilizarse muestras contaminadas con microorganismos que hayan recibido un tratamiento a base de calor ni muestras que contengan partículas visibles. No debe utilizarse suero muy hemolizado ni suero icterico. Tras la recogida, el suero debe separarse del coágulo. El documento H18-A4 del CLSI recomienda las siguientes condiciones de almacenamiento de muestras:

1. No guarde las muestras a temperatura ambiente durante más de 8 horas.
2. Si el análisis no se efectúa en un plazo de 8 horas, refrigere las muestras a una temperatura de 2 a 8 °C.
3. Si el análisis no va a realizarse en un plazo de 48 horas o si debe preparar las muestras para enviarlas, congélelas a una temperatura de -20 °C o inferior. Las muestras congeladas deben mezclarse bien después de descongelarse y antes del análisis.

## **Procedimiento**

---

### **Materiales suministrados**

---

- 1 Cartucho de reactivos QUANTA Flash DGP IgG

### **Materiales adicionales necesarios no suministrados**

---

Instrumento BIO-FLASH con ordenador para manejarlo

Líquido de lavado del sistema BIO-FLASH (número de componente: 3000-8205)

Iniciadores BIO-FLASH (número de componente: 3000-8204)

Cubetas BIO-FLASH (número de componente: 3000-8206)

Calibradores QUANTA Flash DGP IgG (número de componente: 701171)

Controles QUANTA Flash DGP IgG (número de componente: 701172)

## Uso del analizador por quimioluminiscencia BIO-FLASH

---

1. Consulte el manual del operador suministrado con el sistema BIO-FLASH para obtener instrucciones de uso detalladas sobre el analizador por quimioluminiscencia BIO-FLASH y el software BIO-FLASH. Para obtener más información o solucionar problemas relativos a este ensayo, póngase en contacto con el servicio técnico de INOVA Diagnostics, Inc., en la dirección o número de teléfono indicados al final de estas instrucciones de uso.
2. Para vaciar el recipiente de residuos sólidos, abra el cajón de residuos. Retire el recipiente de residuos sólidos y deshágase apropiadamente de las cubetas usadas. Vuelva a colocar el recipiente de residuos sólidos, cierre el cajón de residuos y haga clic en **Yes** en la ventana **Empty Waste Drawer**.
3. Para sustituir los iniciadores, haga clic en el botón **Bulks Inventory F9** de la parte superior derecha.
  - a. En la pantalla **Inventory – Bulks**, haga clic en el botón **Triggers** situado a la izquierda. Se abrirá la ventana **Add Triggers – Remove old bottles**.
  - b. Abra el cajón de residuos del instrumento BIO-FLASH y extráigalo. Tire todas las cubetas del cajón de residuos secos. Haga clic en **Yes** en la ventana **Empty Waste Drawer**. Retire los frascos del iniciador de sus soportes y haga clic en el botón **Next**. Desenrosque los frascos viejos del iniciador de sus tapones y sustitúyalos por nuevos iniciadores. Realice la operación frasco a frasco y respete el código de color de los tapones (blanco-blanco, rojo-rojo).
  - c. Siga las instrucciones de la ventana que se abrirá, **Add Triggers – Add Trigger 2 bottle**. Una vez aceptado el código de barras, coloque el iniciador 2 en el soporte de color blanco. Haga clic en **Next**.
  - d. Siga las instrucciones de la ventana **Add Triggers – Add Trigger 1 bottle**. Una vez aceptado el código de barras, coloque el iniciador 1 en el soporte de color rojo. Haga clic en **Finish**. Vuelva a colocar el cajón de residuos y ciérrelo.
4. Para sustituir el recipiente de líquido de lavado del sistema, haga clic en el botón **Bulks Inventory F9** en la esquina superior derecha. En la pantalla **Inventory – Bulks**, haga clic en el botón **Sys. Rinse**. En la ventana que se abrirá, **Add System Rinse – Remove bottles**, haga clic en **Next**. Siga las instrucciones de la nueva ventana que se abrirá, **Add System Rinse – Add bottle**. Una vez aceptado el código de barras, haga clic en **Finish**, si es necesario.
5. Para vaciar el recipiente de residuos líquidos, en la pantalla **Inventory – Bulks** haga clic en el botón **Fluid Waste**. Extraiga el residuo líquido y elimínelo. Haga clic en **Next**. Una vez sustituido el frasco vacío, haga clic en **Finish**.

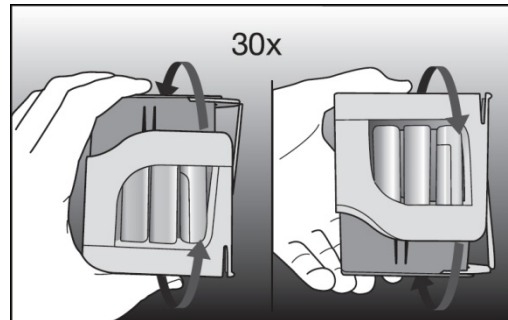
## Método

### Preparación del cartucho de reactivos

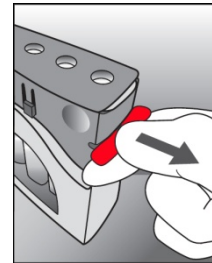
La primera vez que se utilice el cartucho de reactivos, deben seguirse los pasos indicados a continuación para instalarlo adecuadamente en el instrumento BIO-FLASH. Nota: No utilice el cartucho de reactivos si presenta cualquier signo de daño.

Cartucho de reactivos QUANTA Flash DGP IgG: Durante el envío y el almacenamiento, las micropartículas se depositan y es preciso mezclarlas para volver a suspenderlas.

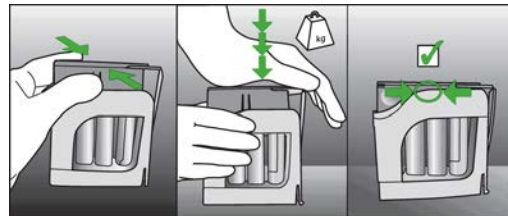
1. La primera vez que utilice el cartucho, inviértalo suavemente 30 veces, evitando la formación de espuma. Compruebe que las micropartículas se resuspenden completamente. Si las micropartículas no se han resuspendido totalmente, siga invirtiendo el cartucho hasta que se produzca la resuspensión. Si las micropartículas no se resuspenden, **NO UTILICE EL CARTUCHO**.



2. Una vez que se hayan resuspendido las micropartículas, coloque el cartucho de reactivos sobre una superficie sólida para retirar la pestaña roja. Con una mano, sostenga el cartucho de reactivos en su lugar. Con la otra mano, agarre con fuerza la pestaña roja de la parte posterior del cartucho de reactivos y tire de ella completamente.



3. Mientras pulsa las dos pestañas laterales del tapón de perforación (parte gris), aplique presión a la parte superior del cartucho de reactivos hasta que descienda y alcance un tope. Las pestañas deben quedar ocultas. **NO INVIERTE EL CARTUCHO ABIERTO**.



4. Coloque con cuidado el cartucho de reactivos en cualquier ranura abierta del carro de reactivos del instrumento BIO-FLASH.

### Calibración del ensayo

1. Cada nuevo lote de cartucho de reactivos debe calibrarse antes del primer uso. El software no permitirá usar un lote nuevo hasta que se calibre.
2. Consulte el apartado **QUANTA Flash® DGP IgG Calibrators 701171** del presente documento para obtener instrucciones de uso detalladas sobre cómo calibrar el cartucho de reactivos.
3. Una vez validada la calibración, el lote de cartuchos de reactivos en el que se ha efectuado la calibración estará preparado para utilizarse.

## Programación y análisis de las muestras

1. Pulse el botón **Worklist** de la parte superior de la pantalla y seleccione la pestaña **Racks** de la parte inferior.
2. Seleccione la gradilla de muestras que se utilizará, marcándola en la pantalla o escaneando su código de barras con el lector manual de códigos de barras. Escanee o escriba el nombre de la muestra, indique el tipo de muestra, elija el tipo de recipiente (tubo/copa) y seleccione DGP IgG en el panel del ensayo. Repita estos pasos para todas las muestras.
3. Cargue las muestras en las posiciones seleccionadas de la gradilla de muestras y coloque la gradilla en el carrusel de muestras del instrumento.
4. Cuando todos los materiales necesarios estén cargados en el instrumento, el icono **Start F4** pasará a estar disponible, en color verde, en la parte superior de la pantalla. Pulse el icono **Start F4** para comenzar el análisis.

## Control de calidad

Los controles QUANTA Flash DGP IgG (vendidos por separado; número de producto de INOVA: 701172) contienen los controles positivos y negativos del QUANTA Flash DGP IgG. Consulte el apartado **QUANTA Flash® DGP IgG Controls 701172** de este documento para obtener instrucciones detalladas sobre cómo introducir en el software todos los datos necesarios de cada control y cómo analizar los controles. Se recomienda analizar los controles una vez cada día en que se utilice el ensayo, aunque los usuarios también deben tener en cuenta los requisitos de la legislación nacional y local.

## Cálculo de los resultados

Se genera una curva maestra de seis puntos en INOVA para cada nuevo lote de QUANTA Flash DGP IgG. Los parámetros de esta curva se codifican mediante el código de barras de cada cartucho de reactivos. Durante la calibración se utilizará una curva de trabajo específica del instrumento para convertir las RLU a CU. La reactividad del anticuerpo IgG frente al DGP puede entonces clasificarse según la tabla siguiente.

<u>Reactividad</u>	<u>(CU)</u>
Negativa	< 20
Positiva débil	20-30
Positiva	> 30

La reactividad expresada en CU está directamente relacionada con la valoración del anticuerpo de la muestra del paciente. Los aumentos y las disminuciones de la concentración de anticuerpo en los pacientes se reflejará en un correspondiente aumento o disminución de las CU, que son proporcionales a la cantidad de anticuerpo.

El rango de medición analítica (AMR) del ensayo (determinado por los puntos mínimo y máximo de la curva maestra) va de 2,8 CU a 1.936,7 CU, que corresponde al rango lineal del ensayo. Si el resultado de un paciente es inferior a 2,8 CU, el sistema BIO-FLASH indicará "< 2,8 CU". Dado que es un valor inferior a 20 CU, el resultado se considera negativo. Si el resultado de un paciente es superior a 1.936,7 CU, el sistema BIO-FLASH lo indicará como "> 1.936,7 CU". Este valor se considera un resultado positivo. El software BIO-FLASH dispone de una opción denominada Auto-Rerun ("reanálisis automático"). Cuando esta opción está seleccionada, el instrumento volverá a analizar automáticamente todas las muestras cuyo resultado sea > 1.936,7 CU, después de efectuar una dilución adicional en un factor de 10 para que el valor medido se encuentre dentro del AMR. El software calculará el resultado final teniendo en cuenta el factor de dilución adicional aplicado. Dado que el máximo valor que puede medirse es 1.936,7 CU, el valor más alto que puede notificarse es 19.367 CU.



## Interpretación de los resultados

Se aconseja que cada laboratorio verifique el intervalo de referencia indicado por el fabricante y, si lo desea, establezca su propio intervalo normal a partir de sus propios controles y su población de pacientes, de acuerdo con sus procedimientos particulares.

Es recomendable que los resultados comunicados por el laboratorio incluyan la información siguiente: “Los siguientes resultados se han obtenido mediante el inmunoensayo por quimioluminiscencia QUANTA Flash DGP IgG de INOVA. Es posible que los valores obtenidos con métodos de ensayo de otros fabricantes no sean intercambiables con dichos resultados”.

## Limitaciones del procedimiento

1. No todos los pacientes con celiaquía o DH son positivos frente a los anticuerpos IgG anti-DGP.
2. Los resultados de este ensayo deben utilizarse junto con los datos clínicos y otras pruebas serológicas.
3. Si no se mezclan correctamente los reactivos antes del primer uso, pueden obtenerse resultados erróneos.
4. Las características de funcionamiento de este ensayo no se han establecido para matrices de muestras distintas del suero.

## Valores esperados

El resultado esperado en la población normal es “negativo”. Dado que la prevalencia de celiaquía en la población sin riesgo se acerca al 1%,<sup>19</sup> pueden esperarse resultados positivos ocasionales cuando se analicen personas sanas. En el análisis de muestras de suero de 232 personas aparentemente sanas mediante el CIA QUANTA Flash DGP IgG realizado en INOVA Diagnostics, se han obtenido cuatro resultados positivos y un positivo débil.

## Comparación de métodos con un instrumento destinado al mismo fin

Las muestras usadas en la comparación de métodos fueron las de los estudios de validación clínica (pacientes con celiaquía, sin celiaquía y con DH) que se encontraban dentro del rango de medición analítica del ensayo. Dichas muestras se analizaron mediante el QUANTA Flash DGP IgG y un ELISA destinado al mismo fin.

Comparación de métodos (N = 241)		ELISA DGP IgG			Porcentaje de concordancia (confianza del 95%)
		Positivo	Negativo	Total	
QUANTA Flash® DGP IgG CIA	Positivo	78	26*	104	Conc, positiva = 95,1% (88,0-98,7%)
	Negativo	4**	133	137	Conc, negativa = 83,6% (77,0-89,0%)
	Total	82	159	241	Conc. total = 87,6% (82,7-91,4%)

\* Trece muestras son de pacientes celíacos; tres de ellos siguen una dieta sin gluten. Una muestra procede de un paciente que se sospecha que es celíaco; dicho paciente ha sido positivo en cuanto a la IgA anti-DGP. Dos muestras proceden de pacientes con gastritis por *H. pylori*, dos son de pacientes con hepatitis vírica y una corresponde a un paciente con artritis reumatoide. Un paciente con bajo recuento hemático ha sido positivo en cuanto a la IgG anti-h-tTG. Las 6 muestras restantes proceden de personas aparentemente sanas; una de ellas tenía síntomas gastrointestinales en el momento de la recogida y dos eran positivas en cuanto a la IgA anti-h-tTG.

\*\* Tres muestras pertenecen a pacientes celíacos y una corresponde a un paciente con DH.

## Sensibilidad y especificidad clínicas

El estudio de validación clínica comprendió 62 muestras celíacas de la biblioteca de sueros de INOVA (incluidas 7 muestras con deficiencia selectiva de IgA), 87 controles sin celiaquía y 23 muestras de pacientes con DH. Un estudio externo independiente incluyó 102 muestras celíacas (incluidas 9 muestras con deficiencia selectiva de IgA), 151 muestras de personas con síntomas que buscaron atención médica en las que se excluyó la celiaquía tras el examen físico y análisis diagnósticos y, finalmente, 98 controles con celiaquía. Todas las muestras se analizaron con el QUANTA Flash DGP IgG. Los resultados se han procesado para calcular la sensibilidad y la especificidad correspondientes a la celiaquía CD (n = 148), la celiaquía acompañada de deficiencia selectiva de IgA (n = 16) y la DH (n = 23) por separado.

Sensibilidad y especificidad clínicas del ensayo QUANTA Flash DGP IgG para la celiaquía:

N = 484		Diagnóstico			Análisis (confianza del 95%)
		Celiaquía	Sin celiaquía	Total	
QUANTA Flash® DGP IgG	Positivo	132	9*	141	Sensibilidad = 89,2% (83,0-93,7%)
	Negativo	16**	327	343	Especificidad = 97,3% (95,0-98,8%)
	Total	148	336	484	

\* Dos pacientes tenían gastritis por *H. pylori*, dos más sufrían hepatitis vírica y uno presentaba artritis reumatoide. Las demás muestras proceden de personas aparentemente sanas, y dos de ellas han dado positivo en el EIA DGP IgG.

\*\* De los 13 pacientes con datos de ELISA, 10 fueron negativos en el EIA DGP IgG.

Sensibilidad y especificidad clínicas del ensayo QUANTA Flash DGP IgG para la celiaquía con deficiencia de IgA:

N = 352		Diagnóstico			Análisis (confianza del 95%)
		Celiaquía (con deficiencia de IgA)	Sin celiaquía	Total	
QUANTA Flash® DGP IgG	Positivo	9	9	18	Sensibilidad = 56,3% (29,9-80,2%)
	Negativo	7	327	334	Especificidad = 97,3% (95,0-98,8%)
	Total	16	336	352	

Sensibilidad y especificidad clínicas del ensayo QUANTA Flash DGP IgG para la DH:

N = 359		Diagnóstico			Análisis (confianza del 95%)
		DH	Sin DH	Total	
QUANTA Flash® DGP IgG	Positivo	16	9*	25	Sensibilidad = 69,6% (47,1-86,8%)
	Negativo	7**	327	334	Especificidad = 97,3% (95,0-98,8%)
	Total	23	336	359	

\* Dos muestras pertenecían a pacientes con gastritis por *H. pylori* y una provenía de un paciente con artritis reumatoide. Las demás muestras proceden de personas aparentemente sanas, y dos de ellas han dado positivo en el EIA DGP IgG.

\*\* Cinco muestras fueron también negativas en el EIA DGP IgG.



Distribución de la población de control de la enfermedad utilizada en el estudio de validación:

Grupo de pacientes	N	Negativo	Positivo	Porcentaje de positivos
Enfermedad hepática autoinmune	5	5	0	0%
Hepatitis vírica	31	29	2	6%
Enfermedad inflamatoria intestinal (Chron + UC)	17	17	0	0%
Infección por <i>H. pylori</i>	17	15	2	12%
Alergia alimentaria	9	9	0	0%
Enfermedad reumática sistémica	12	12	0	0%
Enfermedad tiroidea autoinmunitaria	22	22	0	0%
Pacientes con síntomas gastrointestinales	11	11	0	0%
Diabetes mellitus tipo 1	14	14	0	0%
Artritis reumatoide	37	36	1	3%
Otras enfermedades infecciosas (VIH, sífilis)	10	10	0	0%
<b>Total</b>	<b>185</b>	<b>180</b>	<b>5</b>	<b>3%</b>

Resumen de los valores de sensibilidad y especificidad clínicas para la celiacía según grupos de edad:

Grupo de edad	DGP IgG	
	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
1 mes - 2 años	66,7	94,6
2 años - 12 años	95,6	96,1
12-21 años	75,0	100,0
> 21 años	89,4	97,8
< 21 años (total)	88,9	96,4
Total	89,2	97,3

## Precisión y reproducibilidad

La precisión del ensayo QUANTA Flash DGP IgG se ha evaluado en 8 muestras que contenían varias concentraciones de anticuerpos IgG anti-DGP, de acuerdo con el documento EP5-A2 del CLSI. Los datos obtenidos se resumen a continuación:

Muestra	Número de réplicas	Media (CU)	Intraensayo		Interensayo		Interdía		Total	
			DE (CU)	CV (%)	DE (CU)	CV (%)	DE (CU)	CV (%)	DE (CU)	CV (%)
1	80	5,8	0,2	3,1%	0,1	2,5%	0,1	2,0%	0,3	4,5%
2	80	16,8	0,5	3,0%	0,1	0,5%	0,2	1,5%	0,6	3,3%
3	80	20,7	0,5	2,5%	0,3	1,3%	0,5	2,2%	0,7	3,6%
4	80	24,6	0,5	1,9%	0,5	1,8%	0,4	1,5%	0,7	3,0%
5	80	85,1	1,9	2,2%	0,8	0,9%	2,5	2,9%	3,2	3,8%
6	80	411,6	7,7	1,9%	6,8	1,6%	9,4	2,3%	13,9	3,4%
7	80	791,0	24,3	3,1%	16,2	2,0%	5,9	0,7%	29,8	3,8%
8	80	1.781,4	52,1	2,9%	27,9	1,6%	48,3	2,7%	76,3	4,3%

Además, se han realizado estudios de precisión en tres laboratorios de análisis diferentes (en INOVA Diagnostics Inc. y en dos laboratorios externos) para evaluar la reproducibilidad. En el laboratorio de INOVA se han incluido como variables dos lotes de reactivos, dos lotes de calibradores y dos operadores. La reproducibilidad total se ha calculado según una precisión intraensayo, interensayo, interlote, entre lotes de calibrador, entre operadores e interlaboratorio:

Muestra	Media (CU)	Número de réplicas	Intraensayo		Interensayo		Entre lotes de reactivo		Entre lotes de calibrador		Entre operadores		Inter-laboratorio		Total	
			DE (CU)	CV (%)	DE (CU)	CV (%)	DE (CU)	CV (%)	DE (CU)	CV (%)	DE (CU)	CV (%)	DE (CU)	CV (%)	DE (CU)	CV (%)
Muestra 1	13,4	80	0,3	2,6	0,8	5,9	0,5	4,0	1,0	7,5	0,5	3,6	1,0	8,1	1,8	13,5
Muestra 2	21,0	80	0,5	2,3	1,2	5,5	0,7	3,5	1,5	7,3	0,8	4,0	1,5	7,6	2,7	12,9
Muestra 3	118,9	80	2,8	2,4	5,9	4,9	2,8	2,3	2,8	2,3	4,7	4,0	9,4	8,1	13,0	10,9

## Rango de medición analítica

El límite de detección inferior de este ensayo, determinado según el documento EP17-A del CLSI, es 469,2 RLU, un valor más pequeño que el mínimo del rango de medición analítica (2,8 CU). El AMR, que va de 2,8 CU a 1.936,7 CU, es lineal. Se ha realizado un estudio de linealidad conforme al documento EP6-A del CLSI utilizando 6 muestras de suero con diferentes concentraciones de IgG anti-DGP. Todas las 6 muestras presentaron linealidad de dilución individualmente, y los datos combinados generaron los resultados siguientes con regresión lineal:

Muestra	Intervalo analítico (CU)	Pendiente (IC del 95%)	Intersección en Y (IC del 95%)	R <sup>2</sup>
Todas las muestras	De 1,9 a 2.565,4	1,03 (de 1,02 a 1,04)	4,78 (de -4,99 a 14,54)	1,00

Las muestras positivas con resultados superiores al rango de medición analítica no presentaron efecto de gancho hasta 4.323,7 CU en el ensayo DGP IgG.

## Interferencia y reactividad cruzada

No se ha detectado interferencia con una concentración de hemoglobina de hasta 200 mg/dL, de triglicéridos de hasta 1.000 mg/dL, de colesterol de hasta 224,3 mg/dL, de bilirrubina de hasta 10 mg/dL y de IgM anti-RF de hasta 500 UI/mL.

Se han analizado 185 muestras de pacientes con diversas enfermedades autoinmunes e infecciosas para evaluar la reactividad cruzada. Dos de las 31 muestras con hepatitis vírica, dos de las 17 con infección por *H. pylori* y una de las 37 con artritis reumatoide dieron positivo en el CIA DGP IgG. En conjunto, cinco de las 185 muestras (3%) fueron positivas, lo que indica la ausencia de reactividad cruzada.

## Calibrators

Para uso diagnóstico *In Vitro*

---

### Uso previsto

---

Los calibradores QUANTA Flash DGP IgG están destinados a utilizarse con el inmunoensayo por quimioluminiscencia (CIA) QUANTA Flash DGP IgG. Cada calibrador establece un punto de referencia para la curva de trabajo que sirve para obtener las unidades de quimioluminiscencia (CU) en la determinación de los anticuerpos IgG anti-DGP en suero.

### Resumen y principios del procedimiento

---

El CIA QUANTA Flash DGP IgG utiliza una curva maestra predefinida específica de cada lote que se guarda en el código de barras del cartucho de reactivos. Los calibradores QUANTA Flash DGP IgG están diseñados para generar una curva de trabajo específica del instrumento a partir de los parámetros de la curva maestra, con un punto de decisión basado en las características de rendimiento y en la evaluación clínica del CIA QUANTA Flash DGP IgG. Los calibradores se analizan en varios instrumentos con diversos lotes de reactivos antes de efectuar la asignación de valores.

### Reactivos

---

1. Calibrador QUANTA Flash DGP IgG 1: Dos (2) tubos con código de barras que contienen 0,3 mL de reactivo prediluido listo para usar. Los calibradores contienen anticuerpos IgG humanos anti-DGP en tampón con estabilizantes de proteínas y conservantes.
2. Calibrador QUANTA Flash DGP IgG 2: Dos (2) tubos con código de barras que contienen 0,3 mL de reactivo prediluido listo para usar. Los calibradores contienen anticuerpos IgG humanos anti-DGP en tampón con estabilizantes de proteínas y conservantes.

### Advertencias

---

1. Los calibradores contienen una sustancia química (cloranfenicol al 0,02%) que está clasificada como cancerígena por el Estado de California.
2. Se utiliza azida sódica como conservante. La azida sódica es una sustancia venenosa que puede resultar tóxica si se ingiere o si se absorbe a través de la piel o los ojos. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si utiliza pilas de lavado para eliminar los reactivos, aclare con abundante cantidad de agua para evitar la formación de azidas metálicas.
3. Todo el material de origen humano usado en la preparación de los calibradores para este producto ha sido analizado y ha producido un resultado negativo con respecto a la presencia de anticuerpos frente al VIH, el HBsAg y el VHC, según métodos aprobados por la FDA. Sin embargo, ningún método de análisis puede ofrecer plenas garantías de la ausencia del VIH, el VHB, el VHC u otros agentes infecciosos. Por ello, los calibradores QUANTA Flash DGP IgG deben manipularse como si se tratara de material potencialmente infeccioso.<sup>20</sup>
4. Utilice un equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
5. Los derrames de reactivos deben limpiarse inmediatamente. Cumpla todas las normas estatales y locales sobre protección del medio ambiente cuando elimine residuos.

## Precauciones

---

1. Este producto está destinado a uso diagnóstico *In Vitro*.
2. Los calibradores QUANTA Flash DGP IgG deben utilizarse con el ensayo QUANTA Flash DGP IgG.
3. No transfiera los reactivos de los calibradores a tubos secundarios. El instrumento utiliza los códigos de barras de los tubos para ajustar los calibradores al tipo de análisis adecuado.
4. Los tubos del calibrador, una vez abiertos, pueden utilizarse durante 8 horas si se mantienen destapados y cargados en el instrumento; transcurrido este tiempo, el reactivo debe desecharse.
5. Puede producirse contaminación química de los reactivos como consecuencia de un lavado o un aclarado inadecuados del instrumento. Los restos de sustancias químicas habituales en los laboratorios, como formol, lejía, etanol o detergente, pueden interferir en el análisis. Limpie siempre el instrumento siguiendo las recomendaciones indicadas en el manual del operador del BIO-FLASH.

## Condiciones de conservación

---

1. Guarde los calibradores no abiertos entre 2 y 8 °C. No los congele. Los reactivos permanecen estables hasta la fecha de caducidad si se almacenan y se manipulan tal como está indicado.
2. Los calibradores abiertos deben desecharse al cabo de 8 horas.

## Procedimiento

---

1. Cada nuevo lote de cartucho de reactivos debe calibrarse antes del primer uso. El software no permitirá usar un lote nuevo hasta que se calibre.
2. Cada calibrador debe mezclarse suavemente antes de utilizarlo para garantizar su homogeneidad. Evite la formación de espuma, ya que las burbujas pueden interferir en la detección del nivel de líquido de los instrumentos. Destape los tubos de ambos calibradores y colóquelos en una gradilla de muestras, con los códigos de barras orientados hacia delante a través de las aberturas de la gradilla. Coloque la gradilla de muestras en el carrusel de muestras del instrumento BIO-FLASH y cierre la puerta. El instrumento leerá los códigos de barras de los tubos del calibrador e identificará el cartucho de reactivos adecuado. Consulte el manual del operador suministrado con el sistema BIO-FLASH para obtener instrucciones de uso detalladas sobre el analizador por quimioluminiscencia BIO-FLASH y el software BIO-FLASH.
3. El instrumento analizará cada calibrador por triplicado. Una vez analizados los calibradores, el software solicitará la validación de la calibración. En la pantalla **Instrument Summary**, haga clic en el botón de flecha **Choose more options – Ctrl-M (▼)**. Seleccione **Calibration Ctrl-F3**. En la ventana de calibración, marque el ensayo deseado y haga clic en **Details**.
4. En la ventana que se abrirá, **Calibration Details**, seleccione la calibración que acaba de efectuar. La curva maestra se visualizará como una línea discontinua y la nueva curva de trabajo, como una línea continua. Si los resultados de la calibración son válidos, en la parte inferior izquierda de la pantalla aparecerá un botón de validación. Haga clic en el botón **Validate Calibration**.
5. Una vez validada la calibración, el lote de cartuchos de reactivos calibrado estará listo para ser utilizado. Se recomienda analizar los controles QUANTA Flash DGP IgG (vendidos por separado; número de producto: 701172) tras calibrar un lote de cartuchos de reactivos.

## **Trazabilidad**

---

Actualmente, no existe ningún estándar internacional reconocido para la medición de anticuerpos IgG anti-DGP (péptido de gliadina desamidado).

## **Limitaciones**

---

Estos calibradores están diseñados para realizar 4 calibraciones. El tiempo máximo durante el que los tubos del calibrador pueden permanecer destapados y cargados en el instrumento es de 8 horas. Si los calibradores permanecen destapados en el instrumento durante más de 8 horas, deben desecharse. Si se utilizan los mismos tubos de calibrador durante más de 8 horas, es posible que la calibración del ensayo sea incorrecta, lo que puede generar resultados erróneos.

## Controls

Para uso diagnóstico *In Vitro*

---

### Uso previsto

---

Los controles QUANTA Flash DGP IgG están destinados al control de calidad del kit de inmunoensayo por quimioluminiscencia (CIA) QUANTA Flash DGP IgG.

### Resumen y principios del procedimiento

---

Los controles QUANTA Flash DGP IgG están constituidos por un control negativo y un control positivo. Cada uno de ellos contiene una cantidad diferente de anticuerpos IgG anti-DGP. El control negativo y el control positivo se emplean para monitorizar el rendimiento analítico del inmunoensayo por quimioluminiscencia QUANTA Flash DGP Screen.

### Reactivos

---

1. Control negativo del QUANTA Flash DGP IgG: Dos (2) tubos etiquetados con código de barras que contienen 0,5 mL de reactivo listo para usar. Los controles contienen anticuerpos IgG humanos anti-DGP en tampón con estabilizantes de proteínas y conservantes.
2. Control positivo del QUANTA Flash DGP IgG: Dos (2) tubos etiquetados con código de barras que contienen 0,5 mL de reactivo listo para usar. Los controles contienen anticuerpos IgG humanos anti-DGP en tampón con estabilizantes de proteínas y conservantes.

### Advertencias

---

1. Los controles contienen una sustancia química (cloranfenicol al 0,02%) que está clasificada como cancerígena por el Estado de California.
2. Se utiliza azida sódica como conservante. La azida sódica es una sustancia venenosa que puede resultar tóxica si se ingiere o si se absorbe a través de la piel o los ojos. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o el cobre de las tuberías y formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si utiliza pilas de lavado para eliminar los reactivos, aclare con abundante cantidad de agua para evitar la formación de azidas metálicas.
3. Todo el material de origen humano usado en la preparación de los controles para este producto ha sido analizado y ha dado un resultado negativo con respecto a la presencia de anticuerpos contra el VIH, el HBsAg y el VHC, según métodos aprobados por la FDA. Sin embargo, ningún método de análisis puede ofrecer plenas garantías de la ausencia del VIH, el VHB, el VHC u otros agentes infecciosos. Por ello, los controles QUANTA Flash DGP IgG deben manipularse como si se tratara de material potencialmente infeccioso.<sup>20</sup>
4. Utilice un equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
5. Los derrames de reactivos deben limpiarse inmediatamente. Cumpla todas las normas estatales y locales sobre protección del medio ambiente cuando elimine residuos.

### Precauciones

---

1. Este producto está destinado a uso diagnóstico *In Vitro*.
2. Los controles QUANTA Flash DGP IgG deben utilizarse con el ensayo QUANTA Flash DGP IgG.
3. No transfiera los reactivos de los controles a tubos secundarios. El instrumento utiliza los códigos de barras de los tubos para identificar al control.



4. Cada tubo de control, una vez abierto, es válido para 15 usos como máximo y **en cada uso** puede permanecer una media de **10 minutos** cargado en el instrumento, hasta un total de 2,5 horas.
5. Puede producirse contaminación química de los reactivos como consecuencia de un lavado o un aclarado inadecuados del instrumento. Los restos de sustancias químicas habituales en los laboratorios, como formol, lejía, etanol o detergente, pueden interferir en el análisis. Limpie siempre el instrumento siguiendo las recomendaciones indicadas en el manual del operador del BIO-FLASH.

## Condiciones de conservación

---

1. Guarde los controles no abiertos entre 2 y 8 °C. No los congele. Los reactivos permanecen estables hasta la fecha de caducidad si se almacenan y se manipulan tal como está indicado.
2. Los controles están diseñados para 15 usos, permaneciendo una media de 10 minutos cargados en el instrumento en cada uso. El tiempo total durante el que los tubos del control pueden permanecer destapados, una vez cargados en el instrumento, es de 2,5 horas. Si los controles, cargados en el instrumento, se dejan destapados durante más de 2,5 horas en total, deben desecharse.
3. Para conseguir una estabilidad óptima, retire los controles del sistema inmediatamente después de tomar las muestras y almacénelos tapados a 2-8 °C en el vial original.

## Procedimiento

---

### Para crear nuevos materiales de control de calidad para el ensayo DGP IgG:

1. Antes de utilizar los controles QUANTA Flash DGP IgG por primera vez en el instrumento, introduzca en el software el nombre, el lote, la caducidad, el valor (o dosis) y la DE objetivo.
2. En la pantalla **Instrument Summary**, haga clic en el botón **Choose more options – Ctrl-M (▼)**, señalado con una flecha. Seleccione **QC Ctrl-F2**. Haga clic en el botón **New QC Material**.
3. Cada grupo de control incluye una hoja de datos específica del lote. En primer lugar, introduzca en el software el nombre, el número de lote y la caducidad que figuran en la hoja de datos. A continuación, haga clic en el botón **Add Assay**. En la ventana que se abrirá, compruebe que está marcada la casilla **Show All Assays**. Seleccione el ensayo DGP\_IgG de la lista y haga clic en **Add**. Por último, introduzca la dosis objetivo y la DE objetivo. Haga clic en **Save**. Realice este proceso para ambos controles.

### Para crear un nuevo lote para los materiales de control de calidad existentes:

1. Antes de utilizar un nuevo lote de los controles QUANTA Flash DGP IgG por primera vez, introduzca en el software el lote, la caducidad, el valor (o dosis) y la DE objetivo.
2. En la pantalla **Instrument Summary**, haga clic en el botón de flecha **Choose more options – Ctrl-M (▼)**. Seleccione **QC Ctrl-F2**. Marque el ensayo DGP\_IgG en la columna de la izquierda. A continuación, seleccione el material de control apropiado en la derecha (“DGPGN” para el control negativo o bien “DGPGP” para el control positivo). Haga clic en el botón **New QC Lot**.
3. Cada grupo de control incluye una hoja de datos específica del lote. Introduzca la información de esta hoja de datos en el software. Dicha información debe comprender el número de lote, la caducidad, la dosis objetivo y la DE objetivo. Si es necesario, haga clic en el botón **Add Assay**. En la ventana que se abrirá, compruebe que está marcada la casilla **Show All Assays**. Seleccione el ensayo DGP\_IgG de la lista y haga clic en **Add**. Haga clic en **Save**. Realice este proceso para ambos controles.

Se recomienda analizar los controles del QUANTA Flash DGP IgG una vez cada día en que se utilice el ensayo, aunque los usuarios también deben tener en cuenta los requisitos de la legislación nacional y local.

Cada control debe mezclarse suavemente antes de utilizarlo para garantizar su homogeneidad. Evite la formación de espuma, ya que las burbujas pueden interferir en la detección del nivel de líquido de los instrumentos. Destape los tubos de ambos controles y colóquelos en una gradilla de muestras, con los códigos de barras orientados hacia delante a través de las aberturas de la gradilla. Coloque la gradilla de muestras en el carrusel de muestras del instrumento BIO-FLASH y cierre la puerta. El instrumento leerá los códigos de barras de los tubos del control e identificará el cartucho de reactivos adecuado. Consulte el manual del operador suministrado con el sistema BIO-FLASH para obtener instrucciones de uso detalladas sobre el analizador por quimioluminiscencia BIO-FLASH y el software BIO-FLASH.

## **Trazabilidad**

---

Actualmente, no existe ningún estándar internacional reconocido para la medición de anticuerpos IgG anti-DGP (péptido de gliadina desamidado).

## **Limitaciones**

---

Estos controles están diseñados para 15 usos. La etiqueta de cada tubo de control posee una fila de 15 casillas que pueden marcarse para realizar un seguimiento del número de usos. El tiempo total durante el que los tubos del control pueden permanecer destapados, una vez cargados en el instrumento, es de 2,5 horas. Si los controles, cargados en el instrumento, se mantienen destapados durante más tiempo, deben desecharse.


















## Bibliografía

---

1. Trier JS: **Celiac Sprue**. *New England Journal of Medicine* 1991, **325**:1709-1719.
2. Troncone R, Ferguson A: **Antigliadin antibodies**. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991, **12**:150-158.
3. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Leigeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. **European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease**. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012, **54**:136-60.
4. McMillan SA, Haughton DJ, et al.: **Predictive value for coeliac disease of antibodies to gliadin, endomysium and jejunum in patients attending for jejunal biopsy**. *BMJ* 1991, **303**:1163-1165.
5. Sugai E, Moreno ML et al.: **Celiac disease serology in patients with different pre-test probabilities: Is biopsy avoidable?** *World J Gastroenterol* 2010, **16**:3144-52.
6. Burgin-Wolff A, Gaze H, et al.: **Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease**. *Arch Dis Child* 1991, **66**:941-947.
7. Osman AA, et al.: **B-Cell epitopes of gliadin**. *Clin Exp Immunol* 2000, **121**:248-254.
8. Aleanzi M, et al.: **Celiac disease: Antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides**. *Clinical Chemistry* 2001, **47**:2023-2028.
9. Schwertz E, et al.: **Serologic assay based on gliadin-related nonpeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease**. *Clinical Chemistry* 2004, **50**:2370-2375.
10. Fleckenstein B, Qiao S-W, et al.: **Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides**. *J Biol Chem* 2004, **279**:17607-16.
11. Prince HE: **Evaluations of the INOVA Diagnostics Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Measuring Serum Immunoglobulins G (IgG) and IgA to Deamidated Gliadin Peptides**. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006, **13**:150-151.
12. Sugai E, et al.: **Accuracy of Testing Antibodies to Synthetic Gliadin-Related Peptides in Celiac Disease**. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2006, **4**:1112-1117.
13. Kurppa K, Lindfors K, et al.: **Antibodies against deamidated gliadin peptides in early stage celiac disease**. *J Clin Gastroenterol* 2010 (epub ahead of print).
14. Volta U, Granito A, et al.: **Deamidated gliadin peptide antibodies as a routine test for celiac disease**. *J Clin Gastroenterol* 2010, **44**:186-90.
15. Collin P, et al.: **Selective IgA deficiency and coeliac disease**. *Scand Journal Gastroenterology* 1992, **27**:367-371.
16. Smecuol E, et al.: **Permeability, Zonulin Production, and Enteropathy in Dermatitis Herpetiformis**. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2005, **3**:335-341.
17. Beutner EH, et al.: **Sensitivity and Specificity of IgA-class anti-endomysial antibodies for dermatitis herpetiformis and findings relevant to their pathogenic significance**. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1986, **15**:464-473.
18. Jaskowski TD, Donaldson MR et al.: **Novel screening assay performance in pediatric celiac disease and adult dermatitis herpetiformis**. *JPGN* 2010, **51**:19-23.
19. Fasano A, Berti I, et al.: **Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study**. *Arch Intern Med* 2003, **163**:286-92.
20. **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)**, 5.<sup>a</sup> edición. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 2009.

## Símbolos utilizados

---

	Producto sanitario para diagnóstico <i>In Vitro</i>
	Consulte las instrucciones de uso
	Límites de temperatura
	No reutilizar
	Riesgos biológicos
	Código del lote
	Número de catálogo
	Caducidad
	Fabricante
	Representante autorizado
	Contenido suficiente para < n > análisis
	Control positivo
	Control negativo
	Calibrador 1
	Calibrador 2
	Caja de cartón reciclable
	Mantener en esta posición

QUANTA Flash es una marca comercial registrada de INOVA Diagnostics Inc. BIO-FLASH es una marca comercial registrada de Biokit SA © 2013

Fabricado por:  
INOVA Diagnostics, Inc.  
9900 Old Grove Road  
San Diego, CA 92131  
Estados Unidos de América

Servicio técnico (solo para EE. UU. y Canadá): 877-829-4745  
Servicio técnico (fuera de EE. UU.): 1 858-805-7950  
support@inovadx.com

Representante autorizado en la UE:  
Medical Technology Promedt Consulting GmbH  
Altenhofstrasse 80  
D-66386 St. Ingbert, Alemania  
Tel.: +49-6894-581020  
Fax: +49-6894-581021  
[www.mt-procons.com](http://www.mt-procons.com)

621170ESP

Diciembre de 2013  
Revisión 2

