



Biocare Medical
60 Berry Drive
Pacheco, CA
USA 94553
P: 1-800-799-9499
www.biocare.net

COVER

För *in vitro*-diagnostik

1	TILLGÄNGLIGA PRODUKTFORMAT	2
2	AVSETT ÄNDAMÅL MED PRODUKTEN	2
3	SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING	2
4	PRINCIP FÖR FÖRFARANDET	2
5	BEREDNING, BLANDNING, SPÄDNING	2
6	LEVERERAS SOM	2
7	YTTERLIGARE NÖDVÄNDIGT MATERIAL MEDFÖLJER INTE	3
8	LAGRINGS- OCH STABILITETSFÖRHÅLLANDEN	3
9	FÖRBEREDELSE AV PROV	3
10	VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER	3
11	INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDNING	5
12	KVALITETSKONTROLL.....	5
13	VERIFIERING AV ANALYSEN.....	6
14	FELSÖKNING	6
15	TOLKNING AV RESULTAT.....	6
16	BEGRÄNSNINGAR.....	7
17	PRESTANDA KATASTROFISTIK	7
18	BIBLIOGRAFI.....	7
19	ETIKETT- OCH LÅDSYMBOLER	9
20	ÄNDRINGSLOGG.....	9

Detta dokument är en översättning av dess ursprungliga spanska och engelska versioner. Om du har några frågor om tolkningen av dokumentet kan du läsa originaldokumentet på www.vitro.bio eller begära en kopia från regulatory@vitro.bio



1 TILLGÄNGLIGA PRODUKTFORMAT

VITRO, S.A. Ref.	BIOCARE Ref	Presentation
MAD-003983VSBC	NPRI10002T1300	1 x 2000 ml

Tabell 1. Referenser och presentation

2 AVSETT ÄNDAMÅL MED PRODUKTEN

För *in vitro*-diagnostik. Denna färdiga mineralolja används som en skyddande beläggning för att förhindra avdunstning av Low-AR- och High-AR-lösningar under värmeinducerad antigenhämtning från formalinfixerade paraffinbäddade (FFPE) vävnadssektioner som en del av utförandet av automatiserade immunhistokemiprotokoll (IHC). Den är designad för användning av kvalificerade yrkespersoner som är utbildade i immunhistokemiska tekniker. Den kliniska tolkningen av eventuell färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska studier med hjälp av lämpliga kontroller och bör utvärderas inom ramen för patientens kliniska historia och andra diagnostiska tester av en kvalificerad patolog.

Denna produkt är avsedd för personer i alla åldrar som behöver analys av detektion av antigener med immunhistokemiska tekniker.

3 SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Cover-produkten består av mineralolja och dess funktion är att bilda en skyddande beläggning för att förhindra avdunstning under värmeinducerad antigenhämtning från formalinfixerade inbäddade vävnadssektioner som en del av en IHC-färgningsprocedur på NeoPATH Pro automatiserade infärgningsmedel. Denna produkt tillhandahålls i ett format som är färdigt att använda.

4 PRINCIP FÖR FÖRFARANDET

I allmänhet möjliggör immunhistokemiska (IHC) färgningstekniker visualisering av antigener genom sekventiell applicering av en specifik antikropp mot antigenet (primär antikropp), en sekundär antikropp mot den primära antikroppen (länkantikropp), ett enzymkomplex och ett kromogent substrat med mellanliggande tvättsteg. Den enzymatiska aktiveringen av kromogen resulterar i en synlig reaktionsprodukt vid antigenstället. Provet kan då vara motfärgat och täckglas. Resultaten tolkas med hjälp av ett ljusmikroskop och hjälper till vid differentialdiagnos av patofysiologiska processer, som kan eller inte kan vara associerade med ett visst antigen.

Mineralolja används som en skyddande beläggning för att förhindra avdunstning av Low-AR- och High AR-lösningar under värmeinducerad antigenhämtning i NeoPATH Pro. Antigenhämtning har avsevärt förbättrat immunhistokemisk färgning av antigener i konventionell kirurgisk patologi. Användningen av dessa tekniker har sina bästa fördelar när det gäller nukleära antigener där en anmärkningsvärd ökning av den immunhistokemiska signalintensiteten har observerats.

5 BEREDNING, BLANDNING, SPÄDNING

Denna produkt tillhandahålls i ett format som är färdigt att använda. Det är inte nödvändigt att rekonstituera, blanda eller späda ut den.

6 LEVERERAS SOM

100% Mineralolja



7 YTTERLIGARE NÖDVÄNDIGT MATERIAL MEDFÖLJER INTE

7.1 Reagenser och material

- Primär antikropp
- Dewax Solution, Ref. MAD-004080VS
- High AR, Ref. MAD-004075VS or Low AR MAD-004079VS
- DAB Enhancer, Ref. MAD-001560QV
- Contrast Hematoxylin HDH3, Ref. MAD-HDH3-100VS
- TBS Tween 20 Buffer 10X, Ref. MAD-004077R-10
- Cleaning Solution 10X, Ref. MAD-003931CSVS
- Probe Cleaning Kit, Ref. MAD-PCLK
- Master Polymer Plus Detection System, Ref. MAD-000237QKVS
- IHC Treated Slides, Ref. MAD-15-188-55/100
- Mixing Tubes, Ref. MAD-60732-100VS

7.2 Utrustning

- NeoPATH Pro
- Optiskt mikroskop och/eller digital skanner av histologiska objektglas

8 LAGRINGS- OCH STABILITETSFÖRHÅLLANDEN

Komponent	Villkor för användning
Förvaringsförhållanden	Förvara i rumstemperatur (15°-25°C) och håll dig borta från källor till intensiv värme/kyla fram till produktens utgångsdatum.
Stabilitet vid användning	När den har öppnats, förvara i rumstemperatur (15°-25°C) och håll den borta från källor till intensiv värme/kyla fram till produktens utgångsdatum.
Leveransvillkor	Leveransen bör utföras i rumstemperatur (15-25°C).

Tabell 2. Lagrings- och stabilitetsförhållanden.

Produkten är stabil till utgångsdatumet som är tryckt på etiketten när den förvaras vid 15°-25°C. Använd inte efter utgångsdatum.

9 FÖRBEREDELSE AV PROV

Paraffinsektioner: Vävnader fixerade i *formalin* är lämpliga för användning före paraffininbäddning. Benvävnader bör avkalkas före vävnadsbearbetning för att underlätta vävnadsskärning och förhindra skador på mikrotombladen.

10 VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- **Läs bruksanvisningen innan du använder denna produkt.** Vid atypiska eller oväntade resultat, kontakta din auktoriserade leverantör/distributör.
- **Professionell användning.** Denna produkt är endast avsedd för professionella laboratorieändamål, och den är inte avsedd för farmakologisk, hushålls- eller någon annan typ av användning. När produkten används som ett hjälpmedel för diagnos bör den endast hanteras av utbildade användare och i auktoriserade laboratorier.
-  **Läkarordinerat test.** Denna produkt är endast avsedd för professionellt bruk på recept av en läkare eller annan sjukvårdspersonal.

- Prover, före och efter fixering, och allt material som utsätts för dem, bör hanteras som om de kan överföra infektion och kasseras med lämpliga försiktighetsåtgärder. Pipettera aldrig reagenser genom munnen och undvik att komma i kontakt med hud och slemhinnor med reagenser och prover. Om reagenser eller prover kommer i kontakt med känsliga områden, tvätta med rikliga mängder vatten.
- Mikrobiell kontaminering av reagenser kan resultera i en ökning av ospecifik färgning och/eller felaktiga resultat.
- Inkubationstider eller andra temperaturer än de som anges kan ge felaktiga resultat. Användaren måste validera alla sådana ändringar.
- Använd inte reagens efter utgångsdatumet som är tryckt på etiketten.
- **Allvarligt tillbud.** Alla allvarliga incidenter relaterade till användningen av denna produkt som innebär eller kan innebära en allvarlig försämring, tillfällig eller permanent, av hälsotillståndet för en patient, användare eller annan person, eller till och med dödsfall, eller ett allvarligt hot mot folkhälsan, måste rapporteras så snart som möjligt till tillverkaren via e-post på regulatory@vitro.bio och till den behöriga hälsomyndigheten i det EU-land där användaren eller patienten är etablerad. Om användaren befinner sig i USA, rapportera alla allvarliga incidenter relaterade till denna enhet genom att kontakta den lokala distributören (information identifierad på produktmärkningen) och tillämplig behörig myndighet i medlemsstaten. Incidenter som orsakas av felaktig användning av produkten eller av användning av produkten utöver den livslängd som fastställts på dess märkning kommer att vara användarens ansvar.
- **Säkerhets- och avfallshanteringsföreskrifterna beskrivs i säkerhetsdatabladet för denna produkt.** Den aktuella versionen av säkerhetsdatabladet (SDS) för denna produkt kan laddas ner på webbplatsen. Läs mer på www.vitro.bio eller begärs på regulatory@vitro.bio.
- **Avfallshantering:** Hanteringen av avfall som genereras vid användning av de produkter som saluförs av Vitro S.A. måste utföras i enlighet med tillämplig lag i det land där dessa produkter används. Som referens anger följande tabell klassificeringen av avfall som genereras av detta kit enligt europeisk lag, särskilt enligt *Europeiska kommissionens beslut av den 18 december 2014 om ändring av beslut 2000/532/EG om förteckningen över avfall enligt Europaparlamentets och rådets direktiv 2008/98/EG*:

POTENTIELLT AVFALL SOM GENERERAS EFTER ANVÄNDNING AV DENNA PRODUKT	ELW*-KOD	TYP AV AVFALL ENLIGT ELW*
Behållare för reagenser som används klassificerade som farliga (enligt säkerhetsdatabladet).	150110	"Behållare som innehåller avfall eller som är förorenade av farliga ämnen"
Vattenhaltigt flytande avfall som innehåller farliga ämnen (ej lösningsmedel).	161001	"Vätskor som genereras vid användning av automatiska IHC/HIS-instrument: -Avfallsdeponering av immunfärgningsmedel. - använde PT-Module buffertar"
Förbrukningsvaror (rör, spetsar, etc.). Alla element som har varit i kontakt med vävnadsprover.	180103	"Avfall vars insamling och bortskaffande omfattas av särskilda krav för att förhindra smitta"
Vätskor som innehåller lösningsmedel (xylo, hematoxylin, alkohol, eosin) som framställs genom immunfärgningstekniker.	160506	"Laboratoriekemikalier som består av eller innehåller farliga ämnen, inklusive blandningar av laboratoriekemikalier"

Tabell 3. Klassificering av avfall som genereras vid användning av detta kit enligt europeisk lagstiftning. *ELW: *Europeisk lagstiftning om avfall.*

***Notera:** Denna klassificering ingår som en allmän riktlinje, eftersom det är under användarens slutliga ansvar att alla lokala, regionala och nationella bestämmelser om kassering av denna typ av material genomförs.

11 INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDNING

Tillsätt den bruksfärdig täcklösningen till NeoPATH Pro COVER-kolven 1 innan immunfärgningsprocessen i instrumentet påbörjas. Följ de primära antikropparnas rekommenderade protokoll och villkor för användning. Inkubationstider och temperaturer kommer att variera beroende på det specifika antikropsprotokoll som följs.

12 KVALITETSKONTROLL

Skillnader i vävnadsbearbetning och tekniska förfaranden i användarens laboratorium kan ge upphov till betydande variationer i resultaten, vilket gör det nödvändigt att utföra egenkontroller regelbundet utöver de följande förfarandena. Konsultera riktlinjerna för kvalitetskontroll i kvalitetsstandarderna för design och implementering av immunhistokemiska analyser; Godkänd riktlinje - Andra upplagan (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011.

Positiv vävnadskontroll: Externa positiva kontrollmaterial bör vara färsk obduktions-/biopsi-/kirurgiska prover som fixeras, bearbetas och bäddas in så snart som möjligt på samma sätt som patientproverna. Positiva vävnadskontroller är en indikation på korrekt förberedda vävnader och korrekta färgningstekniker. En positiv extern vävnadskontroll för varje uppsättning testbetingelser bör ingå i varje färgningsomgång.

De vävnader som används för de externa positiva kontrollmaterialen bör väljas från patientprover med väl karakteriserade låga nivåer av den positiva målaktiviteten som ger svag positiv färgning. Den låga nivån av positivitet för externa positiva kontroller är utformad för att säkerställa upptäckt av subtila förändringar i den primära antikroppskänsligheten på grund av instabilitet eller problem med IHC-metoden. Kommersiellt tillgängliga vävnadsglas eller prover som bearbetats på ett annat sätt än patientproverna validerar endast reagensens prestanda och verifierar inte vävnadspreparation.

Kända positiva vävnadskontroller bör endast användas för att övervaka att bearbetade vävnader och testreagenser fungerar korrekt, snarare än som ett hjälpmedel vid formulering av en specifik diagnos av patientprover. Om de positiva vävnadskontrollerna inte kan påvisa positiv infärgning bör resultaten med testproverna betraktas som ogiltiga.

Negativ vävnadskontroll: Använd en negativ vävnadskontroll som fastställs, bearbetas och bäddas in på ett sätt som är identiskt med patientprovet/patientproverna vid varje färgningsomgång för att verifiera specificiteten hos den primära IHC-antikroppen för påvisande av målantigenet och för att ge en indikation på specifik bakgrundsfärgning (falsk positiv färgning). Dessutom kan de olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt användas av laboratoriet som interna negativa kontrollställen för att verifiera IHC:s prestandaspecifikationer.

Om specifik färgning (falsk positiv färgning) inträffar i den negativa vävnadskontrollen, bör resultaten med patientproverna betraktas som ogiltiga.

Icke-specifik negativ reagenskontroll: Använd en ospecifik negativ reagenskontroll i stället för den primära antikroppen med en sektion av varje patientprov för att utvärdera ospecifik infärgning och möjliggöra bättre tolkning av specifik färgning vid antigenplatsen. I idealfallet innehåller en negativ reagenskontroll en antikropp som producerats från vävnadsodlingssupernatant på samma sätt som den primära antikroppen, men som inte uppvisar någon specifik reaktivitet med mänskliga vävnader i samma matris/lösning som den primära antikroppen. Enbart spädningsvätska kan användas som ett mindre önskvärt alternativ till de tidigare beskrivna negativa reagenskontrollerna. Inkubationstiden för den negativa reagenskontrollen bör motsvara den för den primära antikroppen.

När paneler med flera antikroppar används på seriesnitt kan de negativa infärgningsområdena på ett objektglas fungera som en negativ/ospecifik bindningsbakgrundskontroll för andra antikroppar.

För att skilja endogen enzymaktivitet eller icke-specifik bindning av enzymer från specifik immunreaktivitet kan ytterligare patientvävnader färgas uteslutande med substrat-kromogen eller enzymkomplex (PAP, avidin-biotin, streptavidin) respektive substrat-kromogen.

13 VERIFIERING AV ANALYSEN

Innan en antikropp eller ett infärgningssystem används för första gången i en diagnostisk procedur bör användaren kontrollera antikroppens specificitet genom att testa den på en serie interna vävnader med kända immunhistokemiska prestandaegenskaper som representerar kända positiva och negativa vävnader. Se de kvalitetskontrollprocedurer som tidigare beskrivits i detta avsnitt av bipacksedeln och rekommendationerna för kvalitetskontroll i CAP Certification Program for Immunohistochemistry och/eller NCCLS IHC-riktlinjerna). Dessa förfaranden för kvalitetskontroll bör upprepas för varje nytt antikroppsparti, eller när som helst.

Det finns en förändring i analysparametrarna.

14 FELSÖKNING

Följ rekommendationerna för det antikroppsspecifika protokollet enligt det medföljande databladet. Om atypiska resultat uppstår, kontakta Vitros regulatoriska avdelning på regulatory@vitro.bio. Om användaren befinner sig i USA, kontakta den lokala distributören (information identifierad på produktmärkningen).

15 TOLKNING AV RESULTAT

Tolkning av resultaten bör göras av en kvalificerad patolog. Färgning med den primära antikroppen tillsammans med tillhörande reagenser bör utföras på patientvävnader och på positiva och negativa kontroller.

Positiv vävnadskontroll: Den positiva vävnadskontrollen som färgats med den primära antikroppen bör undersökas först för att säkerställa att alla reagenser fungerar korrekt. Närvaron av en rödbrun (3,3'-diaminobenzidintetraklorid, DAB) reaktionsprodukt med målcellens (plats i cellen) är en indikation på positiv reaktivitet. Om de positiva vävnadskontrollerna inte kan påvisa positiv infärgning bör alla resultat med testproverna betraktas som ogiltiga.

Negativ vävnadskontroll: Den negativa vävnadskontrollen bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att kontrollera specificiteten i den primära antikroppens märkning av målantigenet. Frånvaron av specifik färgning i den negativa vävnadskontrollen bekräftar frånvaron av korsreaktivitet mellan antikroppar och celler/cellulära komponenter. Om specifik färgning (falsk positiv färgning) inträffar i den negativa externa vävnadskontrollen, bör resultaten med patientprovet betraktas som ogiltiga.

Ospecifik färgning, om den förekommer, har vanligtvis ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från vävnader som är fixerade i alltför hög grad av formalin. Använd intakta celler för tolkning av infärgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgar ofta ospecifikt.

Patientvävnad: Undersök patientprover som färgats med den primära antikroppen sist. Positiv infärgningsintensitet bör bedömas i samband med eventuell ospecifik bakgrundsfärgning av den negativa reagenskontrollen. Som med alla immunhistokemiska tester betyder ett negativt resultat att antigenet inte detekterades, inte att antigenet saknades i de analyserade cellerna/vävnaden. Använd vid behov en panel av antikroppar för att identifiera falskt negativa reaktioner.

Se bruksanvisningen för den primära antikroppen för information om antikroppens immunreaktivitet.

16 BEGRÄNSNINGAR

- Resultaten av testet måste utvärderas av en sjukvårdspersonal i samband med medicinsk historia, kliniska symtom och andra diagnostiska tester.
- Korrekt utförande av testet beror på kvaliteten på provet.
- NeoPATH Pro och tillhörande reagenser ska användas med formalinfixerade paraffinbäddade vävnadssnitt. Användning av någon annan typ av prov kan ge felaktiga resultat och dess prestanda måste verifieras i förväg.
- Immunhistokemi är en diagnostisk process i flera steg som består av specialiserad utbildning i valet av lämpliga reagenser; vävnadsval, fixering och bearbetning; förberedelse av IHC-glas; och tolkning av färgningsresultaten.
- Vävnadsfärgning är beroende av hantering och bearbetning av vävnaden före färgning. Felaktig fixering, frysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan orsaka artefakter, antikroppsfällor eller falskt negativa resultat. Inkonsekventa resultat kan bero på variationer i fixerings- och inbäddningsmetoder eller på inneboende oregelbundenheter i vävnaden.
- Överdriven eller ofullständig motfärgning kan äventyra korrekt tolkning av resultaten.
- Den kliniska tolkningen av positiv eller negativ infärgning bör utvärderas inom ramen för klinisk presentation, morfologi och andra histopatologiska kriterier. Den kliniska tolkningen av positiv eller negativ infärgning bör kompletteras med morfologiska studier med användning av lämpliga positiva och negativa interna och externa kontroller samt andra diagnostiska tester. Det är en kvalificerad patolog som är bekant med korrekt användning av IHC-antikroppar, reagenser och metoder som ansvarar för att tolka alla steg som används för att förbereda och tolka den slutliga IHC-preparationen.
- Tillverkaren tillhandahåller detta reagens för användning enligt de medföljande instruktionerna för IHC på preparerade vävnadssnitt. Varje avvikelse från rekommenderade testförfaranden kan leda till att de förväntade resultaten blir ogiltiga. Lämpliga kontroller måste genomföras och dokumenteras. Användare som avviker från rekommenderade testprocedurer måste ta ansvar för tolkning av patientresultat under dessa omständigheter.
- Vävnader från personer som är infekterade med hepatit B-virus och som innehåller hepatit B-tyrantigen (HBsAg) kan uppvisa ospecifik färgning med pepparrotsperoxid.

17 PRESTANDA KATASTROFISTIK

Reproducerbarheten av Cover-reagens i körning bestämdes genom färgning av 42 objektglas som innehöll samma vävnad. Samma resultat erhöles mellan alla bilder. Reproducerbarheten mellan körningarna bestämdes genom infärgning av objektglas som innehöll samma vävnad på 42 objektglas i två olika utrustningar, två operatörer och olika dagar. Färgning utfördes med hjälp av Ki67- och CD3-protokoll som primära antikroppar. Ytterligare studier genomfördes för att testa ett brett spektrum av antikroppar i olika koncentrationer och olika vävnader på olika dagar, av olika operatörer och olika utrustning under en lång tidsperiod.

18 BIBLIOGRAFI

- Food and Drug Administration. Guidance for Submission of Immunohistochemistry Applications to the FDA. 1997.

- Norton A.J., et al; Brief, high temperature heat denaturation (pressure-cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. J Pathol 173 (4): 371-391(1994).
- Clive R. Taylor, M.D., Ph.D., Shan-Rong Shi, M.D., and Richard J. Cote, M.D. Appl Immunohistochem 4 (3): 144-166, 1996.
- Suthipintawong C., et al; Immunostaining of cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. Diagn Cytopathol 15: 167-174 (1996).
- Shidham VB, Layfield LJ. Cell-blocks and immunohistochemistry. Cytojournal. 2021;18:2. Published 2021 Jan 30. doi:10.25259/Cytojournal_83_2020.
- García del Moral, Raimundo (1993). Interamericana Mc Graw Hill. Laboratorio de anatomía patológica.
- Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, PA 1991;7(9). Order code M29-P.
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
- O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
- Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011.
- Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H, Brigati J. Special report: Quality control in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1989; 92:836.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983;14:767.
- Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980;73:626.



19 ETIKETT- OCH LÅDSYMBOLER

Förklaring av symbolerna på produktetiketten och lådan:

	Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik		Utgångsdatum
	Katalognummer		Gräns för temperatur
	Partiets kod		Tillverkare
	Se bruksanvisningen		Säkerhetsdatablad
	Distributör		Importör

20 ÄNDRINGSLOGG

Datum	Beskrivning
2024-01-23	Skapande av dokumentet.
2024-06-25	Dokumentet uppdateras för att överensstämma med förordning (EU) IVDR 2017/746.
2025-02-27	Dokumentet är uppdaterat för att anpassa det till FDA:s förordning.
2025-02-27	Dokumentet översatt till svenska.