



CARDIAC TROPONIN I/ (cTnI)

Domaine d'utilisation

Le test i-STAT® Cardiac Troponin I (cTnI) est un test de diagnostic *in vitro* pour la détermination quantitative de la troponine cardiaque I (cTnI) dans le sang total ou le plasma. Les dosages de la troponine I cardiaque sont utilisés dans le diagnostic et le traitement de l'infarctus du myocarde ainsi que comme aide dans la stratification du risque des patients atteints de syndromes coronariens aigus en termes de risque relatif de mortalité.

Explication de la méthode

La cartouche de test i-STAT cTnI utilise une méthode de dosage immunoenzymatique (ELISA) à 2 sites. Les anticorps spécifiques de la troponine I (cTnI) cardiaque humaine se situent sur le capteur électrochimique fabriqué sur une puce de silicium. Un conjugué anticorps/enzyme de phosphatase alcaline spécifique d'une portion distincte de la molécule cTnI est couplé à un autre endroit de la puce de silicium du capteur. L'échantillon de sang total ou de plasma est mis en contact avec les capteurs ce qui permet au conjugué d'enzyme de se dissoudre dans l'échantillon. La cTnI présente dans l'échantillon est marquée par la phosphatase alcaline et capturée à la surface du capteur électrochimique lors d'une période d'incubation de sept minutes environ. L'échantillon et le conjugué d'enzyme en excès sont éliminés par un lavage. Le liquide de lavage contient un substrat pour l'enzyme de la phosphatase alcaline. L'enzyme liée au complexe anticorps/antigène/anticorps clive le substrat afin de libérer un produit pouvant être détecté électrochimiquement. Le capteur électrochimique (ampérométrie) mesure ce produit enzymatique qui est proportionnel à la concentration de cTnI dans l'échantillon.

Composition

Chaque cartouche i-STAT cTnI comporte un orifice de remplissage, des capteurs permettant de détecter la cTnI comme décrit ci-dessus et tous les réactifs nécessaires à l'analyse. La cartouche contient également un tampon et des conservateurs. La liste des composants réactifs figure ci-dessous :

Ingrédient réactif	Origine biologique	Quantité minimale
Conjugué anticorps/phosphatase alcaline	IgG caprine : Intestin bovin	0,003 µg
IgG	IgG caprine : IgG murine	8µg : 8 µg
Phosphate aminophényle de sodium	Non applicable	0,9 mg
Héparine	Intestin porcin	0,45 IU
IgM	IgM murine	0,3 µg

Traçabilité métrologique

Le test i-STAT System Cardiac Troponin-I (cTnI) est un test de diagnostic *in vitro* permettant de mesurer la concentration en troponine I cardiaque (cTnI) dans le plasma ou la fraction plasmatique du sang total (dimension ng mL⁻¹). Les valeurs de troponine I cardiaque des contrôles et matériaux de vérification de la calibration i-STAT sont standardisées par rapport au calibrateur de travail i-STAT préparé à partir du complexe de troponines cardiaques humaines ITC (Hy-Test Ltd., Turku, Finland, référence 8T62). Les contrôles et matériaux de vérification de la calibration i-STAT System ont été testés et validés uniquement pour l'utilisation avec le i-STAT System ; les valeurs assignées peuvent ne pas être applicables à d'autres méthodes. De plus amples informations concernant la traçabilité métrologique sont disponibles auprès de Abbott Point of Care Inc.

Domaine de mesure

Le domaine de mesure du test i-STAT cTnI est compris entre 0,00 et 50,00 ng/mL (µg/L). Pour les échantillons présentant des valeurs au-delà du domaine de mesure, le résultat ">50.00 ng/mL" s'affichera à l'écran de l'analyseur. Toutefois, les caractéristiques de performance du test i-STAT cTnI n'ont pas été déterminées pour des valeurs de cTnI supérieures à 35,00 ng/mL (µg/L).

Plage de référence

Des échantillons de sang total et de plasma prélevés sur 162 donneurs apparemment en bonne santé ont été analysés en double à l'aide de trois lots différents de cartouches i-STAT cTnI. La plage de résultats de 0 à 97,5 % se situe entre 0,00 ng/mL (µg/L) et 0,03 ng/mL (µg/L). La plage de résultats de 0 à 99 % se situe entre 0,00 ng/mL (µg/L) et 0,08 ng/mL (µg/L).

Remarque : Chaque établissement devra définir ses propres valeurs de référence pour le test i-STAT cTnI.

Signification clinique

Différents marqueurs cardiaques biochimiques, dont la cTnI, sont utiles pour le diagnostic d'un infarctus du myocarde et la stratification des risques permettant d'orienter les choix thérapeutiques.

Pour une utilité optimale dans le diagnostic, le marqueur cardiaque doit être spécifique au tissu cardiaque, être rapidement libéré dans le sang avec une relation proportionnelle directe entre l'étendue de la lésion myocardique et le taux mesuré du marqueur et persister dans le sang pendant une période de temps assez longue pour fournir une fenêtre de temps de diagnostic appropriée.¹ Les troponines cardiaques, troponine I (cTnI) et troponine T (cTnT) sont considérées comme les marqueurs biochimiques de choix dans l'évaluation de syndromes coronaires aigus (SCA) dont l'infarctus du myocarde avec élévation du segment ST, l'infarctus du myocarde sans élévation du segment ST et l'angor instable.^{2,3} Des taux élevés de troponines cardiaques fournissent des valeurs prédictives au-delà des informations fournies par les signes cliniques et les symptômes des patients, l'ECG lors de la présentation du patient et le test d'effort pré-décharge.¹ Antman et al. rapportent une augmentation statistiquement significative de la mortalité chez les patients présentant des taux élevés de cTnI ($p < 0,001$).⁴ D'autres études ont démontré une augmentation des événements cardiaques non mortels tels que l'infarctus du myocarde non mortel, l'insuffisance cardiaque congestive et une urgente revascularisation en présence de taux croissants de cTnI.^{5,6,7}

La possibilité de mesurer la cTnI à de faibles taux de concentration permet de considérer une intervention thérapeutique lors de toute élévation au-dessus des valeurs normales. Les patients qui ne présentent pas d'élévation du segment ST sur leur courbe ECG mais pour lesquels on observe une élévation même légère de la cTnI ou de la cTnT peuvent être plus réceptifs à certains médicaments tels que les inhibiteurs GP IIb/IIIa ou l'héparine de bas poids moléculaire.^{8,9,10}

Un comité de travail international sous la direction conjointe de la European Society of Cardiology (ESC), du American College of Cardiology Foundation (ACCF), de l'American Heart Association (AHA) et de la World Heart Federation (WHF) a affiné les critères antérieurs applicables à un infarctus du myocarde par une définition universelle de l'infarctus du myocarde préconisant l'utilisation de la cTnI comme biomarqueur de choix en cas d'atteinte myocardique. Conformément au rapport de ce comité, la définition universelle de l'infarctus du myocarde correspond à une augmentation typique et une baisse graduelle de biomarqueurs cardiaques (la troponine de préférence) avec au moins une valeur au-dessus du 99e percentile de la limite supérieure de référence, associée à une ischémie myocardique évidente avec au moins l'une des caractéristiques suivantes : symptômes ischémiques, ondes Q pathologiques sur l'électrocardiogramme (ECG), modifications ECG indiquant une ischémie ou preuve d'une nouvelle perte du myocarde viable

ou d'une nouvelle anomalie de la contractilité régionale de la paroi myocardique à l'examen d'imagerie.² Une valeur élevée de troponine ne permet pas, à elle seule, de diagnostiquer un infarctus du myocarde. Lors de l'évaluation diagnostique d'un infarctus du myocarde suspecté, il est nécessaire de confronter les valeurs de troponine au tableau clinique du patient (antécédents, examen physique) et l'ECG.³ L'utilisation d'échantillons prélevés en série est recommandée pour permettre d'identifier des modifications temporaires au niveau des taux de troponine, caractéristiques d'un IM.^{2,3,11}

Les dosages disponibles dans le commerce ne permettant pas de détecter de façon inéquivoque la cTnI dans le sang des personnes saines, des taux au-delà de la limite supérieure de référence présentent une forte probabilité d'être associées à une nécrose myocardique ;¹² cette probabilité augmente avec la concentration de troponine mesurée. Cependant, par définition, des résultats au-delà de la plage de référence peuvent être observés chez les individus sains en l'absence de nécrose myocardique, par ex., un résultat au-delà du 99ème percentile ne confirme pas la présence de troponine avec une certitude absolue. Il appartient à chaque établissement de déterminer la plage de référence et les taux de décision en fonction de la population desservie et des pratiques cliniques.

Une lésion myocardique aiguë est mise en évidence par des modifications temporaires au niveau des taux de troponine alors que des élévations continues de la troponine peuvent indiquer d'autres maladies chroniques cardiaques ou non cardiaques. Il existe de nombreuses conditions cliniques pouvant conduire à un taux de troponine élevé sans maladie des artères coronaires ischémiques. On compte parmi ces conditions les traumatismes contondants, la myocardite, l'insuffisance cardiaque congestive, l'hypertrophie ventriculaire gauche, etc.^{13,14} Ces conditions cliniques doivent être prises en compte lors de l'interprétation des résultats. L'utilisation de séries d'échantillons analysés à l'aide d'une même méthode de dosage de la troponine permet d'identifier des modifications temporaires de la troponine ou bien de fournir des informations supplémentaires pour le diagnostic en présence de patients présentant des résultats bas. Lorsqu'il y a des incohérences dans les informations cliniques ou lorsque les critères du diagnostic ne sont pas entièrement remplis, il est possible que les résultats soient altérés - voir Limites du test.

Caractéristiques de performance

Les données de précision ont été recueillies dans différents sites de la manière suivante : Chaque contrôle a été testé en double une fois par jour pendant une période de 20 jours, pour un total de 40 répliques. Les moyennes obtenues sont présentées ci-après.

Les données de comparaison de méthodes ont été recueillies conformément au protocole CLSI EP9-A2.¹⁵ Des échantillons de sang veineux ont été prélevés dans des tubes sous vide héparinés et analysés en double sur le i-STAT System. Une fraction de l'échantillon a été centrifugée ; le plasma ainsi obtenu a été analysé en double à l'aide de la méthode de comparaison dans l'heure qui a suivi le prélèvement.

Une analyse de régression Deming¹⁶ a été réalisée sur la première réplique de chaque échantillon. Dans le tableau de comparaison des méthodes, n est le nombre d'échantillons dans le premier jeu de données, Sxx et Syy désignent les estimations des imprécisions en fonction des doubles de la méthode de comparaison et de la méthode i-STAT respectivement. Sy.x est l'écart type de l'estimation et r est le coefficient de corrélation.*

Les comparaisons de méthodes peuvent varier d'un site à l'autre en raison de différences de manipulation des échantillons, de calibration de la méthode de comparaison et de diverses variables liées au site.

Les études d'interférence ont été réalisées sur la base du document EP7 du CLSI.¹⁷

*Pour rappel, nous résumons l'avertissement habituel relatif à l'utilisation de l'analyse de régression. Quel que soit l'analyte étudié, « si les données représentent une plage étroite, l'estimation des paramètres de régression est relativement imprécise et peut être faussée. Les prédictions établies sur la base de ces estimations peuvent donc se révéler non valides ». ¹³ Le coefficient de corrélation, r, peut toutefois permettre de contourner ce problème en servant d'indicateur pour l'évaluation de l'adéquation de la plage de référence de la méthode comparative. D'une manière générale, la plage des données peut être considérée comme adéquate si $r > 0,975$.

Données de précision (ng/mL)

Contrôle	Moyenne	E.T.	CV (%)
Niveau 1	0,53	0,04	7,8
Niveau 2	2,17	0,18	8,5
Niveau 3	31,82	2,42	7,6

Comparaison de méthodes (ng/mL)

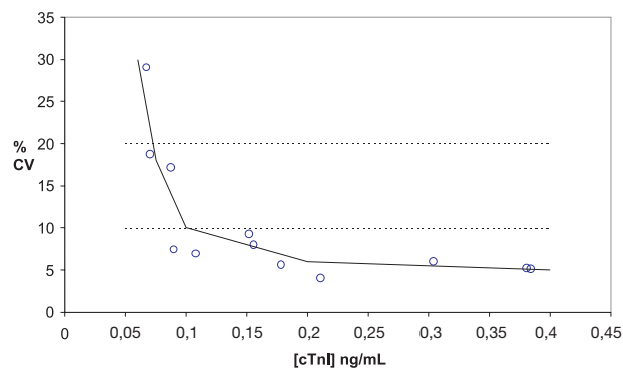
Dade Behring Stratus® CS	
n	189
Sxx	0,28
Syy	0,31
Pente	0,883
Int't	0,029
Sy.x	1,40
Xmin	0,00
Xmax	46,27
r	0,975

Sensibilités analytique et fonctionnelle

La sensibilité analytique de la méthode cTnl est de 0,02 ng/mL, soit le plus faible taux de cTnl pouvant être distingué de zéro. La sensibilité analytique est définie comme la concentration de deux écarts-types d'un échantillon à 0,00 ng/mL.

Une autre caractéristique d'une mesure analytique est la sensibilité fonctionnelle qui est définie comme le taux de cTnl auquel la méthode de test affiche un pourcentage de coefficient de variation particulier (CV %). Les estimations de la sensibilité fonctionnelle de 20 % et de 10 % pour la méthode cTnl ont été déterminées à partir de mesures sur sang total. Les sensibilités fonctionnelles de 20 % et de 10 % pour la méthode cTnl sont 0,07 ng/mL et 0,10 ng/mL respectivement (voir graphique ci-dessous).

Imprécisions de la méthode i-STAT par rapport au niveau de cTnl



Spécificité analytique

La méthode cTnI est spécifique de la troponine I cardiaque. Les protéines musculaires suivantes ont été testées et ont été trouvées avoir un effet insignifiant sur la cTnI mesurée.

Substance interférente	Concentration	Réactivité croisée (%)
Troponine-C (cardiaque)	1 000 ng/mL	< 0,002 %
Troponine-T (cardiaque)	1 000 ng/mL	0,65 %
Troponine-I (squelettique)	1 000 ng/mL	< 0,002 %
Troponine-T (squelettique)	1 000 ng/mL	< 0,002 %

Récupération

La linéarité de dilution du test i-STAT cTnI a été étudiée en utilisant des échantillons de plasma et de sang total hépariné provenant de trois donneurs distincts. Pour chaque donneur, l'échantillon négatif cTnI original et un échantillon surchargé en cTnI ont été préparés. Ceci a permis d'obtenir trois échantillons de sang total positifs cTnI qui ont été analysés en double à l'aide de chacun des trois lots de cartouches i-STAT cTnI différents. Ces échantillons de sang total ont ensuite été dilués avec une quantité égale du sang total non surchargé et analysés en double. La récupération cTnI a été calculée à partir de ces données obtenues pour le sang total.

Le plasma provenant de ces trois donneurs a été combiné en quantités égales, pour toutes les combinaisons de paires. Ces combinaisons ont ensuite été analysés en double à l'aide de chacun des trois lots de cartouches i-STAT cTnI. La récupération cTnI pour chaque paire a été calculé en utilisant la moyenne des 6 résultats. Les pourcentages de récupération sont indiqués dans les tableaux ci-dessous.

Sang total

Echantillon	Concentration	Concentration diluée	% de récupération
A	2,05	1,04	101 %
B	6,31	3,14	100 %
C	27,04	14,05	104 %

Plasma

Echantillon	Concentration	Concentration diluée	Récupération (%)
A	2,41	-----	-----
B	7,50	-----	-----
C	29,35	-----	-----
A+B	-----	4,69	95 %
B+C	-----	18,90	103 %
A+C	-----	16,89	106 %

Limites du test

La fréquence des résultats supprimés est influencée par la pression atmosphérique. Les taux de résultats supprimés peuvent augmenter en altitude élevée (pression atmosphérique abaissée) et peuvent devenir permanents si les tests sont effectués à plus de 2286 mètres au-dessus du niveau de la mer. Quand les résultats doivent être disponibles à tout moment, i-STAT recommande de disposer d'une autre méthode d'analyse.

Les échantillons de patients qui ont été exposés aux animaux ou qui ont bénéficié de procédures thérapeutiques ou diagnostiques utilisant des immunoglobulines ou des réactifs dérivés d'immunoglobulines peuvent contenir des anticorps, tels que les HAMA ou d'autres anticorps hétérophiles, susceptibles d'interférer avec des immunodosages et de produire des résultats erronés.¹⁸⁻²⁴ La production

d'anticorps potentiellement interférents en réponse aux infections bactériennes a été rapportée.¹⁶ Bien que ces produits contiennent des réactifs qui minimisent l'effet de ces substances interférentes et des algorithmes QC pour détecter leurs effets, le risque d'interférences susceptibles de produire des résultats erronés doit être évalué attentivement dès lors qu'il existe des incohérences dans les informations cliniques. Les résultats du test i-STAT cTnI doivent être confrontés à toutes les informations cliniques disponibles. Les décisions médicales ne doivent pas se baser sur un seul dosage i-STAT.¹⁴

La troponine cardiaque peut ne pas apparaître dans le sang circulant pendant les 4 à 6 heures suivant le début de l'apparition des symptômes de l'infarctus du myocarde. Par conséquent, un seul résultat négatif ne suffit pas pour exclure un IM. L'utilisation d'un protocole d'échantillonnage en série est une pratique recommandée.¹¹

En règle générale, les résultats obtenus avec différents dosages de la troponine ne sont pas comparables : CTnI et CTnT sont des molécules distinctes et les résultats ne sont ni interchangeables, ni comparables. Par ailleurs, des différences significatives au niveau des valeurs de troponine absolues peuvent être observées pour un même échantillon patient avec différentes méthodes d'analyse.¹³

Des échantillons présentant une coagulation partielle peuvent générer des résultats de cTnI supérieurs à la plage de référence, de même que des codes d'erreurs de contrôle de qualité. Afin d'éviter de telles erreurs, suite au prélèvement de l'échantillon de sang total dans un tube hépariné, retourner l'échantillon délicatement au moins 10 fois afin d'assurer une dissolution homogène de l'héparine.

Les échantillons fortement hémolysés peuvent diminuer l'activité de la phosphatase alcaline, ce qui a pour résultat de diminuer la détection de cTnI, d'accroître les bruits de fond et/ou de provoquer des codes de contrôle qualité.

Des taux d'hématocrite de l'ordre de 0 à 65 % n'affectent pas les résultats. Les échantillons présentant des taux d'hématocrite supérieurs à cette plage sont susceptibles d'augmenter l'imprécision du test et l'apparition de codes de contrôle de qualité.

L'analyseur doit rester sur une surface plane, affichage vers le haut, durant l'analyse. Le fait de bouger l'analyseur au cours de l'analyse augmente le risque de résultats supprimés ou d'affichage de codes de contrôle qualité. L'exigence de surface plane est également respectée lorsque l'analyseur est placé et utilisé dans le téléchargeur/rechargeur.

Tests d'interférences

Les substances suivantes, ajoutées dans les concentrations indiquées à un pool de plasma contenant environ 2 ng/mL de troponine I cardiaque, n'ont pas démontré d'effet significatif (inférieur à 10 %) sur le test cTnl :

Composé	Concentration testée ($\mu\text{mol/L}$ sauf indication contraire)
Acétaminophène	1660
Allopurinol	294
Acide ascorbique	227
Acide acétyl-salicylique	3330
Aténolol	37,6
Caféine	308
Captopril	23
Chloramphénicol	155
Diclofénac	169
Digoxine	6,15
Dopamine	5,87
Enalaprilat	0,86
Erythromycine	81,6
Furosémide	181
Héparinate de sodium*	36 U/mL
Ibuprofène	2425
Isosorbide dinitrate	636
Méthylidopa	71
Nicotine	6,2
Nifédipine	1,156
Phénytoïne	198
Propranolol	7,71
Acide salicylique	4340
Théophylline	222
Vérapamil	4,4
Warfarine	64,9

*L'héparine à 90 U/mL s'est avéré diminuer les taux de cTnl d'environ 20 %.

Références

1. Braunwald, E, *et al.* ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients with Unstable Angina). 2002. Available at: <http://content.onlinejacc.org/article.aspx?articleid=1130417>.
2. Thygesen K, Alpert JS, White HD, *et al.* Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2007; 116:2634-2653.
3. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, *et al.* ACC/AHA 2007 Guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction). *Circulation*. 2007;116:e148-e304.
4. Antman EM, Tanasijevic, MJ, Thompson B, *et al.* Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *NEJM* 1996, 335(18): 1342-1349.
5. Galvani M, Ottani F, Ferrini D, *et al.* Prognostic influence of elevated values of cardiac troponin I in patients with unstable angina. *Circulation* 1997, 95: 2053-2059.
6. Morrow DA, Rifai N, Tanasijevic MJ, *et al.* Clinical efficacy of three assays for cardiac troponin I for risk stratification in acute coronary syndromes: A thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) IIB substudy. *Clin Chem* 2000, 46(4): 453-460.
7. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, *et al.* Multimarker approach to risk stratification in non-ST-elevation acute coronary syndromes: Simultaneous assessment of troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide. *Circulation* 2002, 105: 1760-1763.
8. Cannon CP, Weintraub WS, Demopoulos LA, *et al.* Comparison of early invasive and conservative strategies in patients with unstable coronary syndromes treated with the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor tirofiban. *NEJM* 2001, 344(25): 1879-1887.
9. Morrow DA, Antman EM, Tanasijevic MJ, *et al.* Cardiac troponin I for stratification of early outcomes and the efficacy of enoxaparin in unstable angina: A TIMI-IIB substudy. *JACC* 2000, 36: 1812-1817.
10. Hamm CW, Heeschen C, Goldmann B, *et al.* Benefit of abciximab in patients with refractory unstable angina in relation to serum troponin T levels (CAPTURE Study Investigators). *NEJM* 1999, 340: 1623-1629.
11. Babuin and Jaffe. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *Can. Med. Assoc. J.* 2005; 173:1191.
12. Hickman *et al.* Cardiac troponin may be released by ischemia alone, without necrosis. *Clin Chem Acta* 2010; 411: 318-323.
13. See "Troponin: What Laboratorians Should know to Manage Elevated Results" at <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/TipsandArticlesonDeviceSafety/ucm109362.htm>.
14. Wu *et al.* NACB Standards of Laboratory Practice: Recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery disease. *Clin. Chem.* 1999; 45:1104.
15. CLSI. *Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline – Second Edition*. CLSI document EP9-A2 [ISBN 1-56238-472-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2002.
16. P.J. Cornbleet and N. Gochman, "Incorrect Least-Squares Regression Coefficients in Method-Comparison Analysis," *Clinical Chemistry* 25:3, 432 (1979).
17. CLSI. *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline*. CLSI document EP7-A [ISBN 1-56238-480-5]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2002.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) *Immunoassay Interference by Endogenous Antibodies; Proposed Guideline*. CLSI document I/LA30-P (ISBN 1-56238-633-6) Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.

19. Bjerner et al. Immunometric Assay Interference: Incidence and Prevention. Clin. Chem. 2002; 48:613.
20. Kricka, Interferences in Immunoassays – Still a Threat. Clin. Chem. 2000; 46:1037.
21. Schroff et al. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. Cancer Res. 1985;45:879.
22. Primus et al. “Sandwich”-type immunoassay of carcinoembryonic antigen in patients receiving murine monoclonal antibodies for diagnosis and therapy. Clin Chem. 1988; 34:261.
23. Nahm et al. Heteroantibody: phantom of the immunoassay. Clin. Chem. 1990; 36:829.
24. Boscato et al. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin. Chem. 1988; 34:27.

i-STAT est une marque déposée du groupe de sociétés Abbott dans plusieurs pays.



Abbott Point of Care Inc.
Abbott Park, IL 60064 • USA



Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands



©2018 Abbott Point of Care Inc. All rights reserved. Printed in USA