



Quantum Blue[®] fCAL extended

Ensaio Quantitativo
de Fluxo Lateral

Para uso em diagnósticos *in vitro*

LF-CALE25 25 tests

Data de lançamento: 2022-07-13
Version A4



BÜHLMANN Laboratories AG

Baselstrasse 55

4124 Schönenbuch, Suíça

Tel.: +41 61 487 12 12

Fax: +41 61 487 12 34

info@buhlmannlabs.ch

PORTUGUÊS

USO PRETENDIDO

O BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended é um teste de diagnóstico *in vitro* para determinação quantitativa de calprotectina em amostras fecais humanas, para uso como auxiliar na avaliação da inflamação da mucosa intestinal. Os resultados do teste podem ser usados como um auxiliar de diagnóstico, ajudando a fazer a distinção entre doenças inflamatórias orgânicas do trato gastrointestinal (doenças intestinais inflamatórias, DII; mais especificamente doença de Crohn ou colite ulcerativa, CU) e doenças funcionais (síndrome do intestino irritável, SII) (ref. 1-7) em pacientes com dor abdominal crônica e também como auxiliar no monitoramento das DII (ref. 7-18).

Somente para uso laboratorial.

PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste permite a determinação quantitativa do antígeno da calprotectina mediante um imunoenensaio tipo sanduiche. A membrana do teste é revestida com um anticorpo de captura monoclonal (mAB) altamente específico para a calprotectina. Um segundo anticorpo de detecção monoclonal conjugado com ouro coloidal encontra-se na zona de dispensação e liberta-se aquando da adição do extrato diluído da amostra de fezes.

O complexo calprotectina/anti-calprotectina conjugado com ouro coloidal liga-se ao anticorpo monoclonal anti-calprotectina que reveste a membrana do teste (linha do teste) e o conjugado anti-calprotectina com ouro coloidal livre liga-se ao anticorpo de cabra que reveste a membrana (linha de controle). As intensidades dos sinais da linha de teste (T) e de controle (C) são quantificadas pelo BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	Quantidade	Código	Observações
Cassete do teste	25 unidades	B-LFCALUS-TC	Embalagem selada a vácuo
Tampão de extração	1 frasco 125 mL	B-CAL-EX	Pronto para uso
Controles baixo* / alto*	2 frascos 0,5 mL	B-CALE-CONSET	Pronto para uso
Cartão chip RFID	1 pedaço	B-CALE-RCC	Cartão de plástico branco
Cartão chip RFID	1 pedaço	B-CALE-RCC720	Cartão de plástico verde
Cartão de código de barras	1 pedaço	B-CALE-BCC	Cartão de código de barras de plástico 2D

Tabela 1

* Os controles contêm quantidades específicas de calprotectina humana no lote. Veja a folha de dados adicional QC para as concentrações reais.

VERIFICAR O KIT DE TESTE

Os produtos BÜHLMANN foram fabricados com o máximo cuidado e foram envidados todos os esforços para assegurar a integralidade deste kit de teste e o seu desempenho. Não obstante, aconselhamos a verificar as condições do cassete de teste e da sua respectiva embalagem no kit com base nos seguintes critérios:

Data de lançamento: 2022-07-13

3/16

- data de validade.
- ausência de danos na embalagem (p. ex., inexistência de perfurações que possam ser causadas por manipulação impróprio).
- ausência de danos no cassete de teste (p. ex., ausência de riscos na membrana analítica).

Caso alguma dos cassetes de teste não cumpra os critérios acima indicados, substitua-o por outro.

ARMAZENAMENTO E VALIDADE DOS REAGENTES

Reagentes não abertos	
Guarde a uma temperatura na faixa de 2 - 8 °C. Não use os reagentes depois da data de validade impressa nas etiquetas.	
Reagentes abertos	
Cassete de teste	Os cassetes de teste removidos da embalagem aluminizada devem ser usados dentro de 4 horas.
Tampão de diluição	Depois de abrir, guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2 - 8 °C.
Controles Baixo / Alto	Depois de abrir, guarde por até 6 meses a uma temperatura na faixa de 2 - 8 °C.

Tabela 2

REAGENTES & MATERIAL FORNECIDO ADICIONALMENTE

Tubos de extração

Os dispositivos de extração fecal descritos na Tabela 3 não são fornecidos com o kit. Os dispositivos de extração selecionados devem ser encomendados separadamente.

Kits de dispositivos de extração	Quantidade	Código
Dispositivo CALEX® Cap	Pacotes de 50, 200 ou 500 tubos disponíveis, cada um preenchido com 5 mL de tampão de extração. Pronto para utilização	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 tubos, consistindo de espátulas e tampas	B-CAL-RD

Tabela 3

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Vortex para extração das fezes
- Pipetas com pontas descartáveis: 10-100 µL, 100-1000 µL e 250-2500 µL
- Centrífuga
- Tubos de propileno ou poliestereno 5 mL para diluição do extrato
- Relógio/cronómetro (opcional)
- Quantum Blue® Reader disponível na BÜHLMANN (referência: BI-POCTR-ABS)
- Toalhetes ou papel absorvente

PRECAUÇÕES

Precauções de segurança

- Os controles deste teste contêm componentes de origem humana. Apesar de testados e apresentarem resultado negativo para antígeno de superfície HBV e

Quantum Blue® fCAL extended

anticorpos HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manipulados como se fossem capazes de transmitir infecções e devem ser manipulados de acordo com as Boas Práticas do Laboratório (BPL), usando as precauções apropriadas.

- Os tampões íons de extração e os controles deste kit contêm um ou mais componentes classificados de acordo com a Regulamentação (CE) n.º 1272/2008: cloridrato de 2-metil-4-isotioazolin-3-ona (conc. \geq 0,0015%). Portanto, os reagentes podem provocar reações alérgicas na pele (H317).
- Amostras dos pacientes devem ser manuseadas como transmissoras de doenças infecciosas e de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais (BPL).
- **Reagentes:** Evite o contato dos reagentes com a pele, os olhos ou as membranas mucosas. Em caso de contato, lave imediatamente com água em abundância, caso contrário, poderá ocorrer irritação.
- Os reagentes e compostos químicos devem ser tratados como resíduos perigosos, em conformidade com as diretrizes ou regulamentações nacionais de segurança de riscos biológicos.

Precauções técnicas

Componentes do kit

- O teste deve ser realizado à temperatura ambiente (18-28 °C).
- Todos os reagentes e amostras devem estar à temperatura ambiente (18-28 °C) antes do início do ensaio.
- Uma vez equilibrado à temperatura ambiente, retire o cassete de teste da bolsa de papel alumínio. Deixe o cassete de teste se equilibrar no ambiente de laboratório por pelo menos 2 minutos antes de iniciar o ensaio.
- Misture bem (vortex) os reagentes antes de usar.
- Componentes não podem ser utilizados após data de expiração impressa nos rótulos.
- Não misture reagentes de lotes diferentes.
- O ensaio é projetado para extratos fecais preparados usando o tampão de extração fornecido no kit ou com o dispositivo CALEX® Cap. O uso de outros tampões de extração pode levar a resultados incorretos.
- Não desmontar os cassetes de teste.
- Manuseie os cassetes de teste com cuidado. Não contamine a porta de carregamento de amostras ou a janela de leitura via contato com a pele, outros líquidos, etc. (figura 1D).
- Assegurar uma posição plana e horizontal do cassete de teste durante a realização do ensaio.
- Os cassetes dos testes não podem ser re-utilizados.

Procedimento do teste

- Ler cuidadosamente as instruções antes de executar o teste. A diluição incorreta dos reagentes, condições de manuseamento e armazenamento diferentes das indicadas na bula afetam negativamente o desempenho do teste.

- Note que há duas gerações de leitores: O Quantum Blue® Reader de 2ª geração com números de série entre 1000 e 3000 (QB2) e o Quantum Blue® Reader de 3ª geração com números de série acima de 3000 (QB3G).
- O leitor QB2 deve ser ligado e programado para o teste Quantum Blue® fCAL extended. Antes de iniciar o ensaio, carregue o método do ensaio usando o cartão com chip RFID (B-CALE-RCC o B-CALE-RCC720) (ver manual do Quantum Blue® Reader).
- O leitor QB3G deve ser ligado e programado para o teste Quantum Blue® fCAL extended usando-se o cartão de código de barras (B-CALE-BCC) ou selecionando-se no menu do teste (somente para o Fast Track Mode). Para mais informações, consulte o manual do Quantum Blue® Reader.
- Utilize o cartão RFID (QB2) / cartão de código de barras (QB3G) para modificar para os parâmetros específicos do lote do teste.
- Amostras de pacientes manuseadas incorretamente podem conduzir a resultados errôneos.
- A fim de receber resultados confiáveis e quantitativos é importante homogeneizar a amostra de fezes inteiramente no tampão de extração dentro do dispositivo de extração.
- Ao utilizar o BÜHLMANN Smart-Prep, é importante centrifugar os extratos antes do armazenamento. Centrifugar os tubos por 5 minutos a 3000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser transferido para um tubo de armazenamento fresco.

COLETA, ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS, ESTABILIDADE

Para o procedimento de extração, menos de 1 g da amostra nativa de fezes será necessário. Colete as amostras de fezes em tubos comuns.

Importante: A amostra deve ser coletada sem nenhum aditivo químico ou biológico.

Transporte das amostras

As amostras de fezes devem ser recebidas pelo laboratório para processamento até 3 dias depois da coleta. Elas devem ser transportadas à temperatura ambiente ou refrigeradas.

Armazenamento das amostras

As amostras de fezes devem ser armazenadas a uma temperatura na faixa de 2-8 °C e extraídas até 3 dias depois de recebidas no laboratório. Não guarde as amostras a temperaturas elevadas.

Estabilidade dos extratos

Os extratos de calprotectina fecal obtidos com o CALEX® Cap permanecem estáveis à temperatura ambiente (23 °C) por 7 dias e, na faixa de temperatura de 2-8 °C, por até 15 dias. Para armazenar por períodos de tempo mais longos, congele os extratos a -20 °C. Os extratos congelados se mantêm estáveis por um período de até 23 meses.

Os extratos do CALEX® Cap podem ser armazenados e congelados diretamente dentro do dispositivo CALEX® Cap. Os extratos podem ser submetidos a até quatro ciclos de congelamento-descongelamento. Antes da medição, deixe os extratos congelados atingirem o equilíbrio à temperatura ambiente. Para reutilização / re-medição dos

extratos consulte o passo 2 no capítulo procedimento de ensaio.

A calprotectina nos extratos obtida pelo método de pesagem manual, com o BÜHLMANN Smart-Prep, permanece estável por ≤ 7 dias a 2-8 °C ou por 36 meses a -20 °C.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

O procedimento do ensaio consiste em 3 passos:

1. Extração das amostras de fezes:

O procedimento de extração está descrito nas instruções de uso fornecidas com os tubos de extração.

Dispositivo CALEX® Cap: As amostras líquidas de fezes podem ser pipetadas diretamente no dispositivo CALEX® Cap. Desenrosque a tampa azul e pipete 10 μ L da amostra de fezes no dispositivo. Recoloque a tampa no dispositivo CALEX® Cap e proceda com a etapa de mistura por vórtex de acordo com o procedimento de extração descrito e ilustrado nas instruções de uso fornecidas com o dispositivo CALEX® Cap.

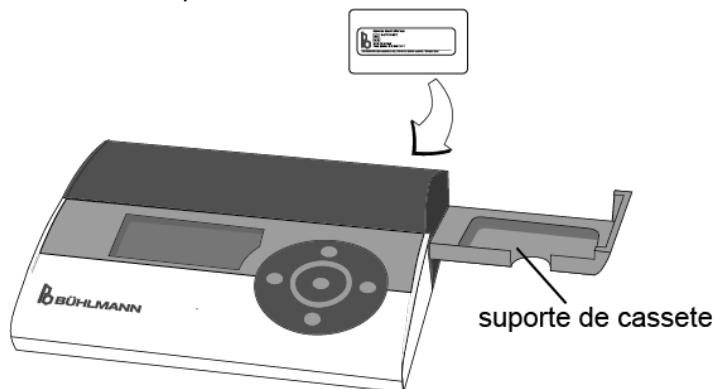
2. Processamento de amostras:

- **Smart-Prep:** Depois da extração, deixar descansar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos. Diluir o sobrenadante antes do teste: 1:10 com tampão de extração (por exemplo: 50 μ L do extrato e 450 μ L de tampão de extração) e misture bem. Deixe os extratos diluídos estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de continuar com o procedimento do teste (passo no. 3.).
- **Dispositivo CALEX® Cap:** Depois da extração, deixar descansar o extrato da amostra de fezes durante 10 minutos com a tampa branca do dispositivo virada para baixo. Abrir a tampa azul. O sobrenadante pode ser utilizado sem qualquer diluição adicional com o ensaio de escoamento lateral.

3. Procedimento de imunocromatografia e leitura:

QB2

Dois métodos alternativos podem ser carregados a partir do respectivo cartão chip: B-CALE-RCC720 (com cronômetro interno) ou B-CALE-RCC (sem cronômetro interno). Selecione um dos cartões com chip RFID antes de iniciar os experimentos. Carregue o método de teste do cartão com chip RFID no Quantum Blue® Reader.



QB3G

Dois modos de operação diferentes são disponibilizados pela BÜHLMANN para a medição de amostras com o

QB3G: Fast Track Mode e Fail Safe Mode. Antes do início do teste, informe-se para identificar o modo de operação do seu leitor.

O método de teste pode ser carregado a partir do cartão de código de barras (Fast Track Mode e Fail Safe Mode) ou selecionado no menu do teste, se já houver sido usado anteriormente (somente para o Fast Track Mode). As medições podem ser realizadas com ou sem um cronômetro interno no Fast Track Mode. No Fail Safe Mode, as medições somente podem ser feitas com um cronômetro interno.

Siga as instruções fornecidas na tela do QB3G. Também é possível consultar os Guias Rápidos do QB3G para o Fast Track Mode e o Fail Safe Mode.



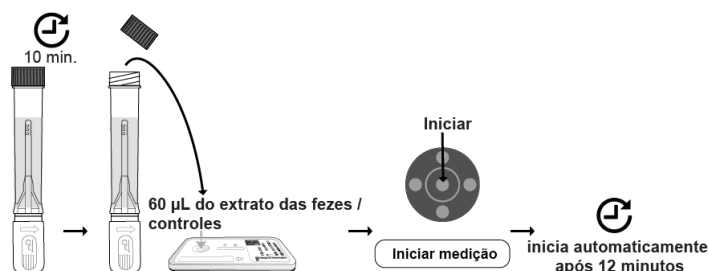
3.1. Método com cronômetro interno

QB2: use o cartão chip RFID verde B-CALE-RCC720

QB3G (Fast Track Mode): quando o QB3G perguntar se você deseja ignorar o tempo de incubação, selecione "NÃO"

QB3G (Fail Safe Mode): configuração padrão

- Tirar o cassete de teste da embalagem e equilibrá-lo por pelo menos 2 minutos no ambiente de laboratório.
- Adicione 60 μ L do extrato das fezes no orifício de carga da amostra de cassete do teste.
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do Quantum Blue® Reader.
- Feche o porta-cassete e inicie a medição pressionando o botão de iniciar no QB2, ou a opção "Iniciar medição" no QB3G.
- A leitura do cassete inicia automaticamente após 12 minutos (720 segundos).
- Para controles baixo / alto: Repita a etapa 3.1 usando 60 μ L do controle em vez do extrato das fezes diluído.



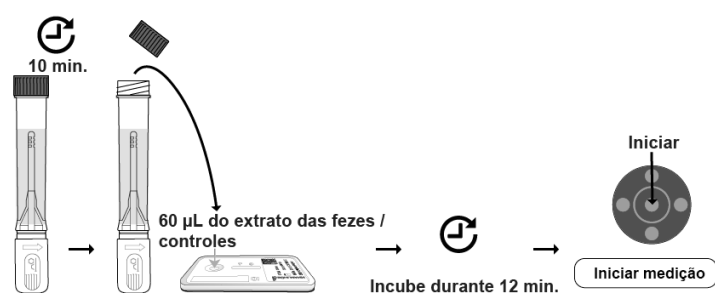
3.2. Método sem cronómetro interno

QB2: use o cartão chip RFID branco B-CALE-RCC

QB3G (Fast Track Mode): quando o QB3G perguntar se você deseja ignorar o tempo de incubação, selecione "SIM"

QB3G (Fail Safe Mode): opção não disponível

- Tirar o cassete de teste da embalagem e equilibrá-lo por pelo menos 2 minutos no ambiente de laboratório.
- Adicione 60 µL do extrato das fezes no orifício de carga da amostra de cassete do teste.
- Incube durante 12 minutos +/- 1 minuto (usando um cronómetro)
- Coloque o cassete do teste no suporte de cassete do Quantum Blue® Reader.
- Faça a leitura do cassete do teste com o Quantum Blue® Reader imediatamente pressionando o botão de iniciar no QB2, ou a opção "Iniciar medição" no QB3G.
- Para controles baixo / alto: Repita a etapa 3.2 usando 60 µL do controle em vez do extrato das fezes diluído.



Nota: Consulte o manual do Quantum Blue® Reader para conhecer as funções básicas e saber como inicializar e operar os Quantum Blue® Readers, especialmente como selecionar métodos de teste e como carregar parâmetros específicos a cada lote a partir do cartão RFID com chip (QB2) / cartão de código de barras (QB3G) no Quantum Blue® Reader. Certifique-se de inserir o cassete do teste corretamente no Quantum Blue® Reader, começando pela janela de leitura (Figura 1D).

CONTROLE DE QUALIDADE

- Se o desempenho do teste não se correlacionar com os limites estabelecidos e as repetições excluírem erros técnicos, verifique o seguinte: i) pipetagem, temperatura e tempos dos diferentes passos, ii) data validade dos reagentes e iii) condições armazenamento e incubação.
- A autocalibração do Quantum Blue® Reader (calibration check) quando é iniciado tem que ser válida.

VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

- Num resultado válido, a linha de controlo (C) tem que ser sempre visível (ver figuras 1A e 1B). É um teste de controlo/validação que não pode ser usado para interpretar a linha de teste (T). Se a linha de teste (T) não for detectável após os 12 min de incubação (figura 1A), a concentração de calprotectina presente na amostra é inferior ao limite de detecção. Se a linha de teste (T) for detectável após os 12 min de incubação (figura 1B), a concentração da calprotectina presente é calculada pelo Quantum Blue® Reader.

- Se apenas a linha de teste (T) for detectável após os 12 min de incubação (figura 1C), o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® fCAL extended tem que ser repetido com outro cassete.
- Se nem a linha de controlo (C) nem a linha de teste (T) forem detectáveis após 12 min de incubação (figura 1D), o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® fCAL extended tem que ser repetido com outro cassete.
- Como o Quantum Blue® Reader permite a avaliação quantitativa das linhas de teste (T) e de controlo (C), há uma validação adicional da linha de controlo (C). Se a intensidade do sinal da linha de controlo (C) for inferior à determinada para esse lote após os 12 min de incubação, o resultado do teste é inválido e o teste de Quantum Blue® fCAL extended tem que ser repetido com outro cassete.

ESTANDARDIZAÇÃO

- Não há materiais de referência reconhecidos internacionalmente ou nacionalmente ou procedimentos de medição de referência para o analito de calprotectina em amostras de fezes. O Quantum Blue® fCAL extended está calibrado/ estandardização com o BÜHLMANN fCAL® ELISA (referência: EK-CAL), que é padronizado usando material de referência interno.
- O BÜHLMANN Quantum Blue® Reader utiliza uma curva padrão específica do lote para calcular a concentração de calprotectina. O intervalo de confiança de 95% da incerteza combinada do calibrador do produto é inferior a 20,0%, a incerteza combinada dos controles é inferior a 30,0%.
- A gama de calibração varia de 30 a 1000 µg/g.
- Para receber resultados quantitativos para a concentração de calprotectina entre 850-1800 µg/g, as amostras elevadas acima de 850 µg/g podem ser testadas novamente com o teste BÜHLMANN Quantum Blue® high range (código de ordem: LF-CHR25).

LIMITAÇÕES

- Os reagentes fornecidos com o kit Quantum Blue® fCAL extended destinam-se somente à determinação de níveis de calprotectina em amostras fecais humanas.
- Os valores da calprotectina fecal servem para auxiliar no diagnóstico e facilitar a distinção entre doenças orgânicas e doenças funcionais, e para auxiliar no monitoramento de DII (doenças inflamatórias intestinais). Os resultados devem sempre ser interpretados em combinação a outros resultados clínicos e laboratoriais.
- Para o monitoramento de DII, sugeriu-se que diversas medições da calprotectina fecal realizadas em intervalos de até 4 semanas possibilitam a melhor precisão de diagnóstico na previsão da recidiva clínica em pacientes (ref. 19-20).
- Em casos raros, quando os níveis de calprotectina são extremamente altos (acima de 5000 µg/g, i.e., em colite ulcerativa aguda), o sistema de teste pode tender a apresentar um efeito gancho com dose elevada, o que pode resultar em valores abaixo do limite superior de

1000 µg/g esperado para a faixa linear. Aconselha-se a prestar particular atenção a resultados acima de 300 µg/g quando acompanhados de sintomas marcantes.

- Pacientes que estiverem tomando anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) regularmente podem apresentar níveis elevados de calprotectina fecal.
- Os resultados podem não ser clinicamente aplicáveis a crianças menores de 4 anos de idade que tenham níveis de calprotectina fecais levemente aumentados (ref. 21-24).

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

I. Como distinguir doenças orgânicas de doenças gastrointestinais funcionais

A determinação dos níveis de calprotectina fecal pode ser usada como um método auxiliar confiável e simples para distinguir as doenças gastrointestinais orgânicas das funcionais (ref. 1-7).

As categorias de resultados baseiam-se nos dados de estudos clínicos realizados pela BÜHLMANN e são recomendações da BÜHLMANN. Todos os resultados dos testes devem ser interpretados em conjunto com as informações disponíveis dos sintomas clínicos do paciente, seu histórico médico e outros resultados clínicos e laboratoriais.

Limiar clínico

Os dados a seguir foram determinados com o BÜHLMANN fCAL® ELISA (código de pedido: EK-CAL).

Os resultados de 58 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com SII e de 131 amostras clínicas de pacientes diagnosticados com DIIs (provenientes de um estudo clínico internacional) foram analisadas para se obter os valores descritos na tabela 3.

Concentração de calprotectina	Interpretação	Acompanhamento
< 80 µg/g	Normal	Nenhum
80 – 160 µg/g	Zona cinzenta/limítrofe	Retorno dentro de 4-6 semanas
> 160 µg/g	Elevada	Repetir conforme necessário

Tabela 4

Valores de calprotectina abaixo de 80 µg/g

Valores de calprotectina fecal abaixo de 80 µg/g não são indicativos de inflamação do trato gastrointestinal. Os pacientes com baixos níveis de calprotectina fecal provavelmente não requerem procedimentos invasivos para determinação da causa da inflamação.

Valores de calprotectina entre 80 e 160 µg/g

Os níveis intermediários de calprotectina (entre 80 e 160 µg/g, inclusive), também conhecidos como níveis da zona cinzenta, não são diretamente indicativos de inflamação ativa que necessite de acompanhamento imediato com testes invasivos. Todavia, a presença de inflamação não pode ser descartada. A reavaliação dos níveis de calprotectina fecal depois de 4 a 6 semanas é recomendada para determinação do status inflamatório.

Valores de calprotectina maiores que 160 µg/g

Valores de calprotectina acima de 160 µg/g são indicativos de infiltrado de neutrófilos no trato gastrointestinal e, portanto, podem significar a presença de doença

inflamatória ativa. Sugere-se a execução de procedimentos de investigação adicionais apropriados, conduzidos por especialistas, para se obter um diagnóstico clínico completo.

Avaliação clínica

A capacidade do Quantum Blue® fCAL extended de fazer a distinção entre pacientes com DII e outros distúrbios não inflamatórios gastrointestinais, incluindo SII, foi avaliada usando-se amostras clínicas coletadas de 278 pacientes e extraídas com o auxílio do dispositivo CALEX® Cap. Cento e vinte e quatro (124) pacientes apresentaram um diagnóstico final de DII (doença de Crohn, colite ulcerativa ou colite indeterminada), 92 pacientes sofriam de SII e 62 apresentavam dor abdominal, diarreia ou outras condições não inflamatórias associadas ao trato gastrointestinal (GI) (tabelas 5) O diagnóstico final foi corroborado por resultados endoscópicos e outros resultados clínicos.

Uma sensibilidade clínica de 91,9% a 80 µg/g e uma especificidade clínica de 78,6% a 160 µg/g podem ser atingidas na diferenciação entre DIIs e condições não inflamatórias associadas ao trato GI, incluindo a SII. A análise de ROC resultou em uma curva AUC de 0,901 (consulte a tabela 6).

Uma sensibilidade clínica de 91,9% a 80 µg/g e uma especificidade clínica de 80,4% a 160 µg/g podem ser atingidas na diferenciação entre DIIs e a SII. A análise de ROC resultou em uma curva AUC de 0,913 (consulte a tabela 7).

A combinação ótima de ponto de corte para esses grupos de pacientes pôde ser definida por análise de ROC a 80 µg/g e 160 µg/g de calprotectina, valores ligeiramente mais restritivos que uma combinação de **um ponto de corte inferior mais sensível de 50 µg/g** com um desempenho mais baixo em especificidade, e **um ponto de corte superior de 200 µg/g**, com uma sensibilidade ligeiramente mais baixa (tabelas 8 e 9).

II. Monitoramento de DII

Limiares e avaliação clínica

A determinação da calprotectina fecal também é uma forma confiável e simples de auxiliar no monitoramento de pacientes com DII (ref. 7-18).

As categorias de resultados mostradas são recomendações e sua determinação se baseia no conhecimento condensado de valores de corte e estudos de desempenho clínico publicados. Aconselha-se que os profissionais de saúde definam limiares individuais para cada paciente a partir da determinação do nível de base de calprotectina durante a remissão da doença.

Valores de calprotectina abaixo de 100 µg/g

Níveis de calprotectina fecal abaixo de 100 µg/g podem indicar confiavelmente pacientes com baixo risco de recidiva clínica que estão em remissão endoscópica e para os quais procedimentos endoscópicos invasivos podem ser evitados (ref. 7-18).

Valores de calprotectina entre 100 e 300 µg/g

Níveis de calprotectina fecal entre 100 e 300 µg/g podem indicar a necessidade de um controle mais rigoroso no período seguinte para avaliar as tendências de desenvolvimento da doença.

Valores de calprotectina acima de 300 µg/g

Níveis de calprotectina fecal acima de 300 µg/g requerem a repetição do teste e, se confirmados os níveis elevados, indicam a necessidade de execução de procedimentos adicionais de investigação (ref. 7-18).

Avaliação clínica

A correlação entre os níveis de calprotectina e o status inflamatório da mucosa intestinal do paciente, de acordo com avaliações endoscópicas, foi determinada em três estudos independentes usando testes de calprotectina da BÜHLMANN (tabela 10). Determinou-se o valor do diagnóstico da calprotectina na predição da remissão e recidiva clínicas em três estudos usando-se testes de calprotectina da BÜHLMANN (tabela 11), de acordo com os sintomas dos pacientes, os índices de atividade clínica, e a necessidade não planejada de intensificação de terapia, hospitalização ou emergência.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

As características de desempenho apresentadas foram estabelecidas no Quantum Blue® Reader 3ª geração, com a exceção da linearidade apresentada para ambas as gerações de leitores.

O Quantum Blue® fCAL estendido foi validado em ambos os instrumentos Quantum Blue® Reader 2ª e 3ª geração. As especificações de caracteres de desempenho indicadas aplicam-se a ambas as gerações de leitores.

Comparação de métodos

Viés nos pontos de decisão clínica e viés médio: ≤15%:

O estudo de comparação de métodos foi realizado de acordo com a diretriz CLSI EP09-A3. Cento e oitenta e três (183) amostras de fezes extraídas com o dispositivo CALEX® Cap foram medidas em 10 dias com três lotes estendidos de reagentes Quantum Blue® fCAL. Valores de referência, com um intervalo final de concentração de calprotectina de 30,5 a 925,8 µg/g foram estabelecidos em um estudo clínico com o BÜHLMANN fCAL® ELISA usando o método de pesagem e extração manual. Os resultados estão resumidos nas tabelas 12 e 13.

Precisão / Recuperação: dentro de 80%-120%

Oito amostras de extratos de fezes foram perfuradas com 60,2 µg/g e 120,4 µg/g de calprotectina em material calibrador de extratos de fezes, a 5% e 10% do volume de extrato de amostras, respectivamente. Amostras de "linha de base" foram perfuradas com o volume correspondente de tampão de extração. As amostras "linha de base" e "linha de base + espiga" foram medidas em 13 réplicas. Os resultados estão resumidos na tabela 14.

Precisão (repetibilidade): ≤ 25% CV

Precisão intralaboratorial: ≤25% CV

A repetibilidade e a precisão intralaboratorial foram determinadas de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo de 20 dias x 2 corridas x 2 replicatas. Foram testados seis extratos de amostras fecais agrupadas, com concentrações de calprotectina na faixa de 49.9 – 485.0 µg/g. Os resultados estão resumidos na tabela 15.

Precisão entre lotes: ≤25% CV

A precisão entre lotes foi estabelecida de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de estudo de 3 lotes x 5 dias x 5 replicatas, e um modelo de componentes de variância para efeitos aleatórios. Foram testados seis extratos de amostras fecais com concentrações de calprotectina na faixa de 55.3 - 552.5 µg/g µg/g. Os resultados estão resumidos na tabela 16.

Reprodutibilidade entre instrumentos: (Between-instrument reproducibility) ≤25% CV

A precisão entre instrumentos foi estabelecida de acordo com a diretriz CLSI EP05-A3 usando um projeto de estudo com 3 instrumentos x 5 dias x 5 réplicas. Seis amostras de extratos de fezes combinadas com concentrações de calprotectina variando de 48,5 - 502,8 µg/g foram testadas. Os resultados estão resumidos na tabela 17.

Limite de detecção Limit of Detection (LoD): ≤30 µg/g

O LoD foi estabelecido de acordo com a diretriz CLSI EP17-A2 usando a abordagem clássica, análise paramétrica e um LoB <20 µg/g, determinado usando uma análise não paramétrica.

Limite de quantificação (LoQ): ≤ 30 µg/g

O LoQ foi estabelecido de acordo com a diretriz EP17-A2 do CLSI, com base em 90 determinações e uma meta de precisão de 25% do CV.

Linearidade: 25.2 to 908.9 µg/g

A faixa linear do Quantum Blue® fCAL extended foi determinada de acordo com a diretriz EP06-A do CLSI. As medições foram realizadas em 10 réplicas em um total de quatro lotes de reagentes. Um desvio máximo da linearidade de 20% ou 15 µg/g, para amostras abaixo de 75 µg/g, foi permitido. Os resultados estão resumidos na tabela 18.

Efeito gancho com dose elevada

Foram realizados testes de efeito de gancho de alta dose em dois lotes de reagentes. As amostras com concentrações de calprotectina de até 5000 µg/g foram corretamente indicadas como acima de 1000 µg/g para todas as réplicas. Para amostras com concentrações maiores de calprotectina (6308,2 - 11214,4 µg/g) foram observadas réplicas com valores abaixo de 1000 µg/g (643,4 µg/g mais baixo).

PRÉ-ANALÍTICA

Reprodutibilidade da extração – CALEX® Cap: ≤ 30% CV

A reprodutibilidade da extração foi estabelecida de acordo com a diretriz EP05-A3 do CLSI, usando-se um arranjo de 2 dias x 2 operadores x 3 lotes de CALEX® Cap x 2 extrações x 3 replicatas. Foram testadas oito amostras fecais clínicas com concentrações de calprotectina de 51.2 - 615.3 µg/g. Os resultados estão resumidos na tabela 19.

SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

A suscetibilidade do Quantum Blue® fCAL extended assay a produtos farmacêuticos orais, suplementos nutricionais, hemoglobina e micro-organismos enteropatológicos, foi avaliada de acordo com a diretriz EP07-A2 do CLSI, Desvios superiores a 20% nos resultados foram considerados como interferências.

Nenhuma interferência foi detectada com as substâncias listadas na tabela 20 até as concentrações indicadas. Nenhuma interferência foi detectada com os micro-organismos enteropatológicos listados na tabela 21 até os valores listados de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de extrato fecal.

TABELAS E FIGURAS

Resultados dos testes

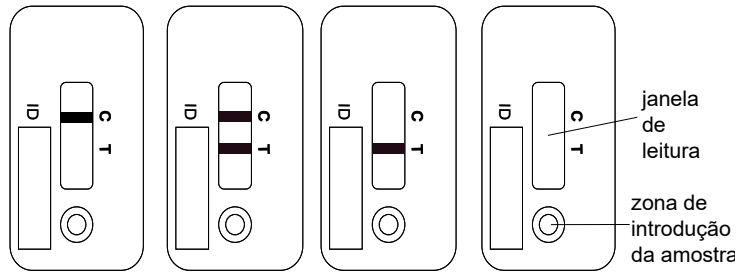


Figura 1A Figura 1B Figura 1C Figura 1D
Figura 1

Estudo clínico – Como distinguir doenças gastrointestinais orgânicas de funcionais

Diagnóstico final	Distribuição dos resultados dos pacientes em números (percentuais) nas faixas de diagnóstico do Quantum Blue® fCAL extended			
	< 80 µg/g	80 - 160 µg/g	> 160 µg/g	Total
DII	10 (8.1%)	12 (9.7%)	102 (82.3%)	124
SII	62 (67.4%)	12 (13.0%)	18 (19.6%)	92
Outras GI	38 (61.3%)	9 (14.5%)	15 (24.2%)	62

Tabela 5

DII vs. não DII	Ponto de decisão clínica	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensibilidade (95% do IC)	91.9% (85.7%, 96.1%)	82.3% (74.4%, 88.5%)
Especificidade (95% do IC)	64.9% (56.8%, 72.4%)	78.6% (71.2%, 84.8%)
VPP (95% do IC)	67.9% (60.2%, 74.8%)	75.6% (67.4%, 82.5%)
VPN (95% do IC)	90.9% (83.9%, 95.6%)	84.6% (77.6%, 90.1%)
AUC da curva ROC (95% do IC)	0.901 (0.865, 0.938)	

Tabela 6

DII vs. SII	Ponto de decisão clínica	
	80 µg/g	160 µg/g
Sensibilidade (95% do IC)	91.9% (85.7%, 96.1%)	82.3% (74.4%, 88.5%)
Especificidade (95% do IC)	67.4% (56.8%, 76.8%)	80.4% (70.9%, 88.0%)
VPP (95% do IC)	79.2% (71.6%, 85.5%)	85.0% (77.3%, 90.9%)
VPN (95% do IC)	86.1% (75.9%, 93.1%)	77.1% (67.4%, 85.0%)
AUC da curva ROC (95% do IC)	0.913 (0.876, 0.950)	

Tabela 7

DII vs. não DII	Ponto de decisão clínica	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensibilidade (95% do IC)	96.0% (90.8%, 98.7%)	79.0% (70.8%, 85.8%)
Especificidade (95% do IC)	50.6% (42.5%, 58.8%)	83.8% (77.0%, 89.2%)
VPP (95% do IC)	61.0% (53.8%, 67.9%)	79.7% (71.5%, 86.4%)
VPN (95% do IC)	94.0% (86.5%, 98.0%)	83.2% (76.4%, 88.7%)

Tabela 8

DII vs. SII	Ponto de decisão clínica	
	50 µg/g	200 µg/g
Sensibilidade (95% do IC)	96.0% (90.8%, 98.7%)	79.0% (70.8%, 85.8%)
Especificidade (95% do IC)	52.2% (41.5%, 62.7%)	83.7% (74.5%, 90.6%)
VPP (95% do IC)	73.0% (65.5%, 79.7%)	86.7% (79.1%, 92.4%)
VPN (95% do IC)	90.6% (79.3%, 96.9%)	74.8% (65.2%, 82.8%)

Tabela 9

Não DII - SII + outras GI

IC – intervalo de confiança

VPP – valor preditivo positivo

VPN – valor preditivo negativo

AUC da curva ROC – área sob a curva característica de operação do receptor

Estudo clínico – Monitoramento de DII

Atividade da calprotectina ¹ vs DII determinada por meio de resultados endoscópicos	Estudo 1 Espanha (ref. 9)	Estudo 2 Espanha (ref. 10)	Estudo 3 Austrália, Nova Zelândia (ref.11)
Quantidade e dados demográficos dos pacientes	89 (DC ²) Faixa etária: 32-58 44% homens	123 (CU ³) Faixa etária: 18-85 66.4% homens	99 (DC ² after resection) Faixa etária: 29-47 46.5% homens
Valor de corte	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
VPN (95% do IC)	98%	86%	91%
VPP	76%	80.3%	53%

Tabela 10

¹ Estudo 1 & 2 – Quantum Blue® fCAL e Quantum Blue® fCAL high range

Estudo 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

² DC = pacientes com doença de Crohn

³ CU = pacientes com colite ulcerativa

Estudo clínico – Monitoramento de DII

Calprotectina ¹ vs remissão ou recidiva clínicas futuras	Estudo 4 Reino Unido (ref. 12)	Estudo 5 Espanha (ref. 13)	Estudo 6 Espanha (ref. 14)
Quantidade e dados demográficos dos pacientes	92 (DC ²) 38% homens	30 (DC ²) terapia com adalimumabe Faixa etária: 24-64 43.3% homens	33 (DC ²) 20 (CU ³) terapia com infliximabe Faixa etária : 18-68 47.2% homens
Data de retorno depois da medição da calprotectina	12 meses	4 meses	12 meses
Pacientes com recidiva clínica depois do retorno	11%	30%	23%
Valor de corte	240 µg/g	204 µg/g	160 µg/g
VPN (95% do IC)	96.8%	100%	96.1%
VPP	27.6%	75%	68.7%

Tabela 11

¹ Study 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

Study 5 & 6 – Quantum Blue® fCAL e Quantum Blue® fCAL high range

² DC = pacientes com doença de Crohn

³ CU = pacientes com colite ulcerativa

TABELAS E FIGURAS

Comparação de métodos

Análise de regressão de Passing-Bablok						
Inclinação (95% do IC)	Intercepto [µg/g] (95% do IC)	Desvio a 80 µg/g (95% do IC)	Desvio a 100 µg/g (95% do IC)	Desvio a 160 µg/g (95% do IC)	Desvio a 300 µg/g (95% do IC)	r
1.123 (1.045, 1.221)	-2.7 (-11.3, 3.6)	8.9% (4.2%, 15.3%)	9.6% (4.6%, 16.8%)	10.6% (4.3%, 19.2%)	11.4% (3.8%, 21.1%)	0.900

Tabela 12

Análise de Bland-Altman		
Desvio médio (95%)	LoA inferior (95% do IC)	LoA superior (95% do IC)
9.7% (4.9%, 14.5%)	-54.6% (-62.8%, -46.4%)	74.0% (65.8%, 82.2%)

Tabela 13

Precisão / Recuperação

ID	Valor do pico [µg/g]	Média da base [µg/g]	Base + spike, esperada [µg/g]	Base + spike, observada [µg/g]	Recuperação [%]
#1	60.2	52	112	110	99
#2	60.2	63	123	127	103
#3	60.2	63	123	131	107
#4	60.2	78	138	137	99
#5	60.2	115	175	179	102
#6	120.4	149	270	272	101
#7	120.4	221	341	341	100
#8	120.4	469	589	559	95

Tabela 14

Precisão intralaboratorial

ID	Média [µg/g]	n	Intracorrída (Repeatability) %CV	Intercorrídas %CV	Interdias %CV	Total precisão %CV
S1	49.9	80	18.2	0.0	5.3	18.9
S2	87.1	80	17.0	0.0	2.9	17.2
S3	135.7	80	11.7	8.9	0.0	14.7
S4	213.2	80	14.5	6.5	1.8	16.0
S5	337.4	80	14.8	3.2	5.0	15.9
S6	485.0	80	21.4	0.0	0.0	21.4

Tabela 15

Precisão entre lotes

ID	Média [µg/g]	n	Intracorrída (Repeatability) %CV	Intercorrídas %CV	Entre lotes %CV	Total precisão %CV
S1	55.3	75	16.6	10.0	0.0	19.4
S2	94.4	75	16.4	8.7	0.0	18.5
S3	155.2	75	20.1	2.6	2.1	20.4
S4	227.0	75	17.3	2.8	0.0	17.5
S5	361.5	75	16.9	2.5	4.8	17.7
S6	552.5	75	17.3	6.8	4.6	19.1

Tabela 16

Reprodutibilidade entre instrumentos

ID	Média [µg/g]	n	Intracorrída (Repeatability) %CV	Interdias %CV	entre instrumentos %CV	Precisão total %CV
L1	48.5	75	16.9	2.4	4.3	17.6
L2	86.9	75	12.4	5.6	0.0	13.6
L3	151.6	75	19.4	3.2	0.0	19.7
L4	224.1	75	17.5	4.2	3.5	18.3
L5	355.0	75	17.0	4.9	0.0	17.7
L6	502.8	75	19.8	7.3	4.5	21.6

Tabela 17

Linearidade

Série de Diluição	Lot	Faixa de medição testada [µg/g]	R2	valor p para coeficiente não linear	Faixa linear [µg/g]
1	M0527	15.5 to 939.1	0.911	<0.0001*	15.5 to 939.1
2	M2128	16.1 to 908.9	0.927	<0.0001*	25.2 to 908.9
3	M3048	11.7 to 972.9	0.856	0.018*	11.7 to 972.9
4	M4851	24.3 to 1004.2	0.939	<0.0001*	24.3 to 1004.2

Tabela 18: * significativo

Pré-analítica Reprodutibilidade da extração

ID	Média [µg/g]	n	Intracorrída %CV	Inter				Total %CV
				extrações %CV	dia %CV	lotes %CV	operadores %CV	
S1	51.2	72	11.7	6.1	10.2	0.0	0.0	16.7
S2	63.5	72	19.0	9.9	4.3	0.0	0.0	21.9
S3	87.4	72	13.2	12.4	1.8	4.6	1.2	18.8
S4	159.5	72	16.6	0.0	5.0	0.0	2.1	17.5
S5	181.4	72	11.6	11.0	0.0	3.5	11.0	19.7
S6	270.5	72	15.1	12.5	6.6	9.6	6.4	23.7
S7	570.8	72	16.9	8.1	5.7	2.0	0.0	19.6
S8	615.3	72	17.0	8.9	9.3	0.0	0.0	21.3

Tabela 19

TABELAS E FIGURAS

Substâncias interferentes

Nome comercial	Componente ativo	Concentração mg/50 mg de fezes
Duofer Fol	Sulfato de ferro (II) (contém 0,4 mg de ácido fólico)	0.11
Prednisona	Prednisona	0.31
Imurek	Azatioprina	0.19
Salofalk	Mesalamina; 5-ASA	5.21
Agopton	Lansoprazol	0.18
Asacol	Mesalamina; 5-ASA	2.50
Vancocina	Vancomicina	2.00
Bactrim	Sulfamethoxazole + Trimethoprim	1.7 + 0.35
Ciproxina	Ciproflaxacina	1.25
Vitamina E	DL- α acetato de tocoferol	0.30
Berocca	<i>B1 (1.4 mg), B2 (1.6 mg), B6 (2 mg), B12 (1 μg), C (60 mg), folic acid (200 mg), nicotinamid (18 mg), pantothenensäure (6 mg), biotin (0.15 mg), calcium (120 mg), magnesium (120 mg), zink (9.5 mg)</i>	1.06
Hemoglobina	Hemoglobina	1.25

Tabela 20

Nome	Concentração final (UFC/ml, extrato fecal)
<i>Escherichia coli</i>	2.9×10^6
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	8.2×10^6
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumonia</i>	4.5×10^6
<i>Citrobacter freundii</i>	5.5×10^6
<i>Shigella flexneri</i>	5.0×10^6
<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i>	5.3×10^6

Tabela 21

REFERÊNCIAS

1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet 356, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. Gut 47,506-513 (2000).
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol 123, 450-460 (2002)
4. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E.: *Measurement of calprotectin in faeces*. Tidsskr Nor Legeforen 128, 743-5 (2008)
5. Manz M et al.: *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study*. BMC Gastroenterology 12, 5 (2012)
6. Pavlidis P. et al.: *Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care*. Scand J Gastroenterol. 48, 1048-54 (2013)
7. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis 12(6), 524-34 (2006)
8. Lin JF et al.: *Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity*. Inflamm Bowel Dis. Aug;20(8), 1407-15 (2014)
9. Lobatón T et al.: *A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease*. J Crohns Coliti, 7(12), 641-51 (2013)
10. Lobatón T et al.: *A new rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis. 19(5), 1034-42 (2013)
11. Wright EK et al.: *Measurement of fecal calprotectin improves monitoring and detection of recurrence of Crohn's disease after surgery*. Gastroenterology. 148(5), 938-947 (2015)
12. Naismith GD et al.: *A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease*. J Crohns Colitis. 8, 1022-9 (2014)
13. Ferreira-Iglesias R et al.: *Usefulness of a rapid faecal calprotectin test to predict relapse in Crohn's disease patients on maintenance treatment with adalimumab*. Scand J Gastroenterol. 23, 1-6 (2015)
14. Ferreira-Iglesias R1 et al.: *Fecal calprotectin as Predictor of Relapse in Patients with Inflammatory Bowel Disease Under Maintenance Infliximab Therapy*. J Clin Gastroenterol. 50(2), 147-51 (2015)
15. Guardiola J. et al.: *Fecal Level of calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis In Clinical And Endoscopic Remission*. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 12(11), 1865-70 (2014)
16. Lasso A et al.: *Pharmacological intervention based on fecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis at high risk of a relapse: A prospective, randomized, controlled study*. United European Gastroenterol J. 3(1), 72-9 (2015)
17. Bressler B et al.: *Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease*. Can J Gastroenterol Hepatol. 29(7), 369-72 (2015)
18. Peyrin-BL et al.: *Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target*. Am J Gastroenterol. 110, 1324-38 (2015)
19. Molander P et al.: *Does Fecal calprotectin Predict Short-Term Relapse After Stopping Tnfalpha-Blocking Agents In Inflammatory Bowel Disease Patients In Deep Remission?* Journal of Crohn's and Colitis, 33-40 (2015)
20. De Vos M et al. *Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy*. Inflamm Bowel Dis. 19, 2111-2117 (2013)
21. Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 40, 450-5 (2005)
22. Li F. et al.: *Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months*. PLoS ONE 10(3) (2015)
23. Zhu Q. et al.: *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS ONE 11 (3) (2016)
24. Peura S. et al.: *Normal values for calprotectin in stool samples of infants from the population-based longitudinal born into life study*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 78(1-2), 120-124 (2018)

HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Data	Versão	Alteração
2022-07-13	A4	Atualização para o capítulo Armazenamento e prazo de validade dos reagentes Atualização do capítulo Reagentes e materiais fornecidos suplementares Atualização do Capítulo <i>Precauções</i> Introdução do Capítulo <i>Danos de transporte</i> Atualização para a padronização do capítulo Atualização para <i>limitação</i> em relação ao efeito de gancho de alta dose Atualização dos dados de <i>desempenho clínico</i> no capítulo "Distinguindo doença orgânica de doença gastrointestinal funcional, Avaliação clínica". Atualização dos dados de desempenho no capítulo <i>Características de desempenho</i> Introdução do capítulo <i>Substâncias interferentes</i> Revisão do Capítulo <i>Símbolos</i> Incluído o número do órgão notificado na marcação CE - procedimento de avaliação de conformidade de acordo com a regulamentação IVDR 2017/746

NOTIFICAÇÃO DE INCIDENTES EM ESTADOS-MEMBROS DA UE







Se algum incidente sério ocorrer associado a este dispositivo, notifique sem demora o fato ao fabricante e à autoridade competente de seu Estado-Membro.

DANOS DE TRANSPORTE

Informe seu distribuidor caso o produto seja recebido danificado.

SÍMBOLOS

BÜHLMANN utiliza símbolos e sinais listados e descritos na ISO 15223-1. Além disso, são utilizados os seguintes símbolos e letreiros:

Símbolo	Explicação
	Cassete de teste
	Tampão de extração
	Controle baixo
	Controle alto
	RFDI cartão Chip
	Cartão de código de barras

Partes do kit são protegidas por patente EP2947459(B1); US10620216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2)

