



Quantum Blue[®] fCAL extended

Kvantitativ
Lateral flödesanalys

För *In Vitro*-diagnostik

LF-CALE25 25 tester

Utgivningsdatum: 2022-07-13
Version A4



Tillverkare

BÜHLMANN Laboratories AG

Baselstrasse 55

4124 Schönenbuch, Schweiz

Tel.: +41 61 487 12 12

Fax: +41 61 487 12 34

info@buhlmannlabs.ch

AVSEDD ANVÄNDNING

BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended är ett *in vitro*-diagnostiskt test för kvantitativ bestämning av kalprotektin i humana avföringsprover, avsett som ett hjälpmedel vid bedömning av inflammation i tarmslemhinnan. Analysresultaten kan användas som ett hjälpmedel för diagnos för att skilja organisk, inflammatorisk sjukdom i mag-tarmkanalen (inflammatorisk tarmsjukdom, IBD, specifikt Crohns sjukdom eller ulcerös kolit, UC) från funktionell sjukdom (irritabel tarm, IBS) (ref. 1-7), hos patienter med kronisk buksmärta och som hjälp vid övervakning av IBD-sjukdom (ref. 7-18).

Endast för användning i laboratorium.

ANALYSENS PRINCIP

Testet är utformat för selektiv mätning av kalprotektin antigen genom sandwich-immunanlys. En monoklonal infångningsantikropp (mAb), med hög specificitet för kalprotektin, är belagd på testmembranet. En andra, monoklonal detektionsantikropp, konjugerad till guldkolloider, deponeras på konjugatfrisättningsdynan och frisätts i reaktionssystemet efter tillsats av det extraherade och utspädda avföringsprovet. Kalprotektin-/antikalprotektin-guldkonjugatet binder till anti-kalprotektin-antikroppen, belagd på testmembranet (testlinjen), och det återstående fria anti-kalprotektin-guldkonjugatet binder till get-anti-mus-antikroppen, belagd på testmembranet (kontrollinje). Signalintensiteterna för testlinjen (T) och kontrollinjen (C) mäts kvantitativt av BÜHLMANN Quantum Blue® Reader.

LEVERERADE REAGENSER OCH FÖRBEREDELSE

Reagenser	Antal	Kod	Kommentarer
Testkassett	25 delar	B-LFCALUS-TC	vakuumförseglad i en foliepåse
Extraktionsbuffert	1 flaska 125 mL	B-CAL-EX	Bruksfärdig
Kontroller Låga*/Höga*	2 flaskor 0,5 mL	B-CALE-CONSET	Bruksfärdig
RFID-chipkort	1 del	B-CALE-RCC	Vitt plastkort
RFID-chipkort	1 del	B-CALE-RCC720	Grönt plastkort
Strekkodskort	1 del	B-CALE-BCC	2 D strekkodskort i plast

Tabell 1

* Kontrollerna innehåller lotspecifika mängder av naturligt, humant kalprotektin. Se det extra kvalitetskontrolldatabladet för faktiska koncentrationer.

KONTROLLERA DITT TESTKIT

BÜHLMANNs produkter har tillverkats med största noggrannhet och alla möjliga ansträngningar har vidtagits för att säkerställa fullständigheten av detta testkit och dess prestanda. Trots detta rekommenderar vi dig att verifiera ditt testkit för tillståndet av testkassetten och dess förpackning baserat på följande kriterier:

- Utgångsdatum
- Förpackningens felfria tillstånd (t.ex. frånvaro av perforation, som kan orsakas av felaktig hantering).

- Testkassetten felfria tillstånd (t.ex. frånvaro av repor på det analytiska membranet).

Om en av testkassetterna inte uppfyller kriterierna ovan, ska en annan testkassett användas.

FÖRVARING OCH HÅLLBARHET FÖR REAGENSER

Öppnade reagenser	
Förvaras vid 2–8 °C. Använd inte reagenserna efter det utgångsdatum som är tryckt på etiketterna.	
Öppnade reagenser	
Testkassett	Testkassetter, som tagits ut ur foliepåsen, måste användas inom 4 timmar.
Extraktionsbuffert	Förvaras i upp till 6 månader vid 2–8 °C efter att den öppnats.
Kontroller Låga/Höga	Förvaras i upp till 6 månader vid 2–8 °C efter att de öppnats.

Tabell 2

REAGENSER OCH LEVERERADE MATERIAL TILLÄGG

Enheter för avföringsextraktion

Enheter för avföringsextraktion, som beskrivs i Tabell 3, levereras inte med kitet. De valda extraktionsenheterna måste beställas separat.

Extraktions-enhetskit	Antal	Kod
CALEX® Cap enhet	Förpackningar med 50, 200 eller 500 rör tillgängliga, fyllda med 5 mL extraktionsbuffert Bruksfärdig	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 rör bestående av spatlar och baslock	B-CAL-RD

Tabell 3

MATERIAL SOM BEHÖVS, MEN INTE INGÅR

- Vortexblandare för avföringsextraktion
- Precisionspipetter med engångsspetsar: 10–100 µL, 100–1000 µL och 250–2500 µL
- Centrifug
- 5 mL polypropen- eller polystyrenrör för utspädning av extrakten
- Timer (valfritt)
- Quantum Blue® Reader tillgänglig från BÜHLMANN (beställningskod: BI-POCTR-ABS)
- Mjuka servetter eller läskpapper

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Säkerhetsåtgärder

- Kontrollerna i detta test innehåller komponenter av humant ursprung. Även om de testats och befunnits negativa för HBV-tytanten, HCV- och HIV1/2-antikroppar, bör reagenserna hanteras som om de kan överföra infektioner och ska hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis (GLP) med lämpliga försiktighetsåtgärder.
- Extraktionsbufferten och kontrollerna i detta kit innehåller komponenter som klassificerats i enlighet med förordning (EG) nr 1272/2008: 2-metyl-4-isotiazolin-3-one-

hydroklorid (konc. $\geq 0,0015\%$), därför kan reagenserna orsaka allergiska hudreaktioner (H317).

- Patientprover ska hanteras som om de kan överföra infektioner och ska hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis (GLP) med lämpliga försiktighetsåtgärder.
- **Reagenser:** Undvik kontakt mellan reagenser och hud, ögon eller slemhinnor. Om kontakt uppstår, tvätta omedelbart med rikliga mängder vatten, annars kan irritation uppstå.
- Reagenser och kemikalier måste behandlas som farligt avfall enligt den nationella säkerhetsriktlinjen eller förordningen för biorisker.

Tekniska åtgärder

Kitkomponenter

- Testet ska utföras i rumstemperatur (18–28 °C).
- Alla reagenser och testprover måste vara rumstempererade (18–28 °C) innan analysen påbörjas.
- När den har kommit i jämvikt till rumstemperatur, ska testkassetten tas ut ur foliepåsen. Låt testkassetten komma i jämvikt i laboriemiljön i minst 2 minuter innan analysen påbörjas.
- Blanda (med vortex) reagenserna väl före användning.
- Kitkomponenter får inte användas efter det utgångsdatum som är tryckt på etiketterna.
- Blanda inte olika lotter av reagenser.
- Analysen är utformad för fekala extrakt, som framställts med hjälp av extraktionsbufferten som finns i kitet eller med CALEX® Cap device. Användningen av andra extraktionsbuffertar kan leda till felaktiga resultat.
- Ta inte isär testkassetterna.
- Hantera testkassetterna varsamt. Kontaminera inte provladdningsporten eller avläsningsfönstret via hudkontakt, andra vätskor etc. (Figur 1D).
- Säkerställ ett plant, horisontellt läge för testkassetten medan analysen utförs.
- Testkassetter kan inte återanvändas.

Testprocedur

- Läs instruktionerna noggrant innan du utför analysen. Analysprestandan kommer att påverkas negativt om reagenserna späds ut, hanteras eller förvaras felaktigt under andra förhållanden än de som beskrivs i denna bruksanvisning.
- Observera att det finns två generationer av läsare: Quantum Blue® Reader 2a generationen med serienummer mellan 1000 och 3000 (QB2) och Quantum Blue® Reader 3e generationen med serienummer över 3000 (QB3G).
- QB2 måste vara påslagen och programmerad för Quantum Blue® fCAL extended analys. Ladda analysmetoden med hjälp av RFID-chipkortet (B-CALE-RCC eller B-CALE-RCC720) innan du startar analysen (se Quantum Blue® Reader manual).
- QB3G måste vara påslagen och programmerad för Quantum Blue® fCAL extended analys, antingen genom att använda streckkodskortet (B-CALE-BCC) eller genom att välja från testmenyn (endast Fast Track Mode). För

mer information, se handboken till Quantum Blue® Reader.

- Använd RFID-chipkortet (QB2)/streckkodskortet (QB3G) för att ändra lotspecifika testparametrar.
- Patientprover som inte hanteras korrekt kan orsaka felaktiga resultat.
- För att få tillförlitliga och kvantitativa resultat är det viktigt att homogenisera avföringsprovet helt i extraktionsbufferten i extraktionsenheten.
- Vid användning av BÜHLMANN Smart-Prep är det viktigt att centrifugera extrakten före lagring. Centrifugera rören i 5 minuter vid 3000 x g. Efter centrifugering måste supernatanten överföras till ett nytt lagringsrör.

PROVINSAMLING, LAGRING, STABILITET

För extraktionsproceduren krävs mindre än 1 g naturligt avföringsprov. Samla avföringsprov i vanliga rör.

Viktigt: Provet måste tas utan några kemiska eller biologiska tillsatser.

Provtransport

Avföringsprover ska tas emot för bearbetning av laboratoriet inom 3 dagar efter insamling. Proverna kan transporteras i rumstemperatur eller kyllda.

Provförvaring

Avföringsprover ska förvaras i kylskåp vid 2–8 °C och extraheras inom 3 dagar efter mottagandet på laboratoriet. Förvara inte prover vid förhöjda temperaturer.

Extraktionsstabilitet

Fekala kalprotektinextrakt erhållna med CALEX® Cap-enheten är stabila vid rumstemperatur (23 °C) i 7 dagar och vid 2–8 °C i upp till 15 dagar. För längre förvaring, frysa extrakten vid -20 °C. Frysta extrakt är stabila i upp till 23 månader.

CALEX® Cap-extrakt kan förvaras och frysas direkt i CALEX® Cap-enheten. Extrakt kan utsättas för fyra frys-upptiningcykler. Före mätning, låt frysta extrakt anta rumstemperatur. För återanvändning/återmätning av extrakten, se steg 2 under kapitlet Analysprocedur.

Fekalt kalprotektinextrakt erhållet av BÜHLMANN Smart-Prep är stabilt vid 2–8 °C i ≤ 7 dagar eller vid -20 °C i 36 månader.

ANALYSPROCEDUR

Analysproceduren består av tre steg:

1. Extraktion av avföringsprover

Extraktionen beskrivs i bruksanvisningen som levereras med respektive extraktionsenhet.

CALEX® Cap-enhet: Flytande avföringsprover kan pipetteras direkt i CALEX® Cap-enheten. Skruva av det blå locket och pipettera 10 μ L avföringsprov i enheten. Sätt på locket på CALEX® Cap-enheten och fortsätt med vortex-steget enligt extraktionsproceduren som beskrivs och illustreras i bruksanvisningen, som levereras med CALEX® Cap-enheten.

2. Provbearbetning

- Smart-Prep: Låt avföringsextraktet sedimentera i 10 minuter efter extraktion. Späd supernatanten 1:10 med extraktionsbuffert (t.ex. 50 μ L avföringsextrakt och

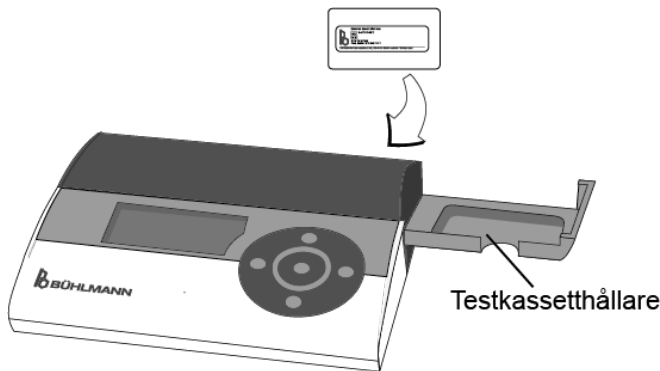
450 µL extraktionsbuffert) och blanda väl. Låt proverna utjämnas i minst 5 minuter vid 18–28 °C innan du fortsätter till nästa steg (steg nr 3).

- CALEX® Cap-enhet: Efter extraktion, låt avföringsextraktet sedimentera i 10 minuter med enhetens vita huvud nedåt. Skruva av det blå locket. Supernatanten kan användas utan ytterligare utspädning i den laterala flödesanalysen.

3. Lateral flödesanalysprocedur och avläsning

QB2

Två alternativa metoder kan laddas från respektive RFID-chipkort: B-CALE-RCC720 (med intern timer) eller B-CALE-RCC (utan intern timer). Välj ett av RFID-chipkortet innan du startar experimenten. Ladda testmetoden från RFID-chipkortet på Quantum Blue® Reader.



QB3G

Två olika driftlägen är tillgängliga från BÜHLMANN för att mäta prover med QB3G: Fast Track-läge eller Fail Safe-läge. Innan du startar analysen, ska du ta reda på i vilket driftläge din avläsare fungerar.

Testmetoden kan laddas från streckkodskortet (Fast Track- och Fail Safe-läge) eller, om den använts tidigare, väljas från testmenyn (endast Fast Track-läge). Mätningar kan utföras med eller utan en intern timer i Fast Track-läge. Mätningar i Fail Safe-läge kan endast utföras med intern timer.

Följ instruktionerna på skärmen på QB3G. Du kan också läsa QB3G snabbguider för Fast Track- och Fail Safe-läge.



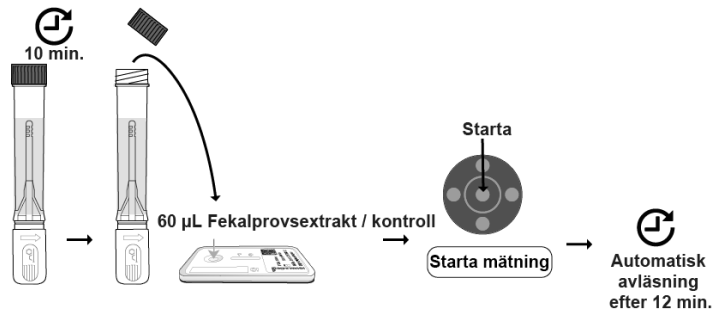
3.1. Metod med intern timer

QB2: använd det gröna RFID-chipkortet B-CALE-RCC720

QB3G (Fast Track-läge): när QB3G uppmanar dig att hoppa över inkubationstiden, välj "NO" (Nej)

QB3G (Fail Safe-läge): standardinställning

- Packa upp testkassetten och låt den komma i jämvikt i minst 2 minuter i laboratoriemiljön.
- Tillsätt 60 µL avföringsextrakt till provladdningsporten på testkassetten.
- Sätt i testkassetten på avläsarens testkassetthållare.
- Stäng testkassetthållaren och starta mätningen genom att trycka på startknappen på QB2 eller alternativet "Starta mätning" på QB3G.
- Skanningen startar automatiskt efter 12 minuter (720 sekunder).
- För låga/höga kontroller: Upprepa steg 3.1 med 60 µL av kontrollmaterial istället för avföringsextrakt.



3.2. Metod utan intern timer

QB2: Använd det vita RFID-chipkortet B-CALE-RCC

QB3G (Fast Track-läge): när QB3G uppmanar dig att hoppa över inkubationstiden, välj "YES" (Ja)

QB3G (Fail Safe-läge): alternativet ej tillgängligt

- Packa upp testkassetten och låt den komma i jämvikt i minst 2 minuter i laboratoriemiljön.
- Tillsätt 60 µL avföringsextrakt till provladdningsporten på testkassetten.
- Inkubera i 12 minuter +/- 1 minut (ställ in en timer manuellt).
- Sätt i testkassetten på avläsarens testkassetthållare.
- Stäng testkassetten med Quantum Blue® Reader omedelbart genom att trycka på startknappen på QB2 eller alternativet "Starta mätning" på QB3G.
- För låga/höga kontroller: Upprepa steg 3.2 med 60 µL kontrollmaterial istället för avföringsextrakt.



Anmärkning: Se manualen till Quantum Blue® Reader för att lära dig mer om de grundläggande funktionerna och hur man startar och använder Quantum Blue® Reader, särskilt hur man väljer testmetoder och hur man laddar lotspecifika parametrar från RFID-chipkortet (QB2)/streckkodskort (QB3G) på Quantum Blue® Reader. Se till att testkassetten förs in korrekt i Quantum Blue® Reader, med avläsningsfönstret först (Figur 1D).

KVALITETSKONTROLL

- Om analysens prestanda inte korrelerar med de fastställda gränserna och upprepning utesluter fel i tekniken, kontrollera följande problem: i) pipettering, temperaturkontroll och timing ii) utgångsdatum för reagenser och iii) lagrings- och inkubationsförhållanden.
- Resultatet av självtestet av Quantum Blue® Reader, som utförs vid start, måste vara giltigt.

VALIDERING AV RESULTAT

- För ett giltigt testresultat måste kontrollinjen (C) alltid vara synlig (se Fig. 1A och 1B). Den används endast som funktionell testkontroll och kan inte användas för tolkning av testlinjen (T). Om testlinjen (T) inte kan detekteras efter 12 minuters inkubationstid (Figur 1A), är koncentrationen av kalprotektin i avföringsprovet under detektionsgränsen. Om en testlinje (T) kan detekteras efter 12 minuters inkubationstid (Figur 1B), beräknas koncentrationen av kalprotektin i avföringsprovet av instrumentet Quantum Blue® Reader.
- Om endast testlinjen (T) kan detekteras efter 12 minuters inkubationstid (Figur 1C), är testresultatet ogiltigt och analysen måste upprepas med en annan testkassett.
- Om varken kontrollinjen (C) eller testlinjen (T) kan detekteras efter 12 minuters inkubationstid (Figur 1D), är testresultatet ogiltigt och analysen måste upprepas med en annan testkassett.
- Eftersom Quantum Blue® Reader tillåter en kvantitativ utvärdering av test- (T) och kontroll- (C) linjerna, utförs en ytterligare giltighetskontroll av kontrollinjen (C). Om signalintensiteten för kontrollinjen (C) är under ett tröskelvärde efter 12 minuters inkubationstid, är testresultatet också ogiltigt och analysen måste upprepas med en annan testkassett.

STANDARDISERING

- Det finns inga internationellt eller nationellt erkända referensmaterial eller referensmätningprocedurer för kalprotektinanalyten i avföringsprov. Quantum Blue® fCAL extended är standardiserad mot BÜHLMANN fCAL® ELISA (beställningskod: EK-CAL), som är standardiserad med hjälp av internt referensmaterial.
- Quantum Blue® Reader använder en lotspecifik standardkurva för att beräkna koncentrationen av kalprotektin. Det 95-procentiga konfidensintervallet för den kombinerade osäkerheten för produktkalibratören är lägre än 20,0 %, den kombinerade osäkerheten för kontrollerna är lägre än 30,0 %.
- Analysintervallet är mellan 30 och 1000 µg/g.
- För att få kvantitativa resultat för kalprotektinkoncentrationer mellan 850–1800 µg/g, kan höga provresultat över 850 µg/g testas om med BÜHLMANN Quantum Blue® high range-testet (beställningskod: LF-CHR25).

BEGRÄNSNINGAR

- Reagenser, som levereras med BÜHLMANN Quantum Blue® fCAL extended kit, är endast avsedda för

bestämning av kalprotektinnivåer i mänskliga avföringsprover.

- Fekala kalprotektinvärden är avsedda som ett hjälpmedel vid diagnos för att skilja organisk sjukdom från funktionell sjukdom och som ett hjälpmedel vid IBD-övervakning. Resultaten ska alltid tolkas i kombination med andra kliniska och laboratoriefynd.
- För övervakning av IBD-sjukdom har flera fekala kalprotektinmätningar, som utförs med upp till 4 veckors intervall, föreslagits ha bästa diagnostiska noggrannhet för att förutsäga kliniskt återfall hos patienter (ref. 19–20).
- I sällsynta fall, när kalprotektinnivåerna är extremt höga (över 5000 µg/g, t.ex. vid akut UC), kan testsystemet vara benäget att ha en high dose hook-effekt, vilket kan leda till värden under den förväntade analysintervallgränsen på 1000 µg/g. Det rekommenderas att vara särskild uppmärksam på resultat över 300 µg/g, när de åtföljs av starka symtom.
- Patienter, som tar NSAID-läkemedel regelbundet, kan ha förhöjda nivåer av fekalt kalprotektin.
- Resultaten är eventuellt inte kliniskt applicerbara på barn under 4 år, som har lätt förhöjda nivåer av fekalt kalprotektin (ref. 21–24).

TOLKNING AV RESULTAT

I. Särskilja organisk sjukdom från funktionell mag-tarmsjukdom

Bestämningen av nivåer av fekalt kalprotektin kan användas som ett pålitligt och enkelt hjälpmedel för att skilja organiska från funktionella gastrointestinala sjukdomar (ref. 1–7). Resultatkategorierna baseras på data från kliniska studier, som utförts av BÜHLMANN, och är BÜHLMANNs rekommendationer. Alla testresultat ska tolkas i samband med tillgänglig information från patientens kliniska symtom, sjukdomshistorik och andra kliniska fynd och laboratoriefynd.

Kliniska tröskelvärden

Följande data etablerades med BÜHLMANN fCAL® ELISA (beställningskod: EK-CAL).

Resultat från 58 kliniska prover, från patienter med diagnosen IBS, och 131 kliniska prover från patienter med diagnosen IBD, från en internationell klinisk studie, analyserades för att få de värden som beskrivs i Tabell 4.

Koncentration av kalprotektin	Tolkning	Uppföljning
< 80 µg/g	Normala	Ingen
80–160 µg/g	Gråzon/Borderline	Uppföljning inom 4–6 veckor
> 160 µg/g	Förhöjda	Upprepa vid behov

Tabell 4

Kalprotektinvärden under 80 µg/g

Fekala kalprotektinvärden <80 µg/g talar inte för inflammation i mag-tarmkanalen. Patienter med låga nivåer av kalprotektin är sannolikt inte i behov av invasiva procedurer för att fastställa orsaken till inflammationen.

Kalprotektinvärden mellan och lika med 80 och 160 µg/g

Fekala kalprotektinnivåer mellan och lika med 80 och 160 µg/g, även kallade gråzonsnivåer, är inte direkt indikativa för en aktiv inflammation som kräver omedelbar
Quantum Blue® fCAL extended

uppföljning med invasiv testning. Förekomsten av inflammation kan dock inte uteslutas. Förnyad utvärdering av fekala kalprotektinnivåer efter 4 till 6 veckor rekommenderas för att fastställa inflammatorisk status.

Kalprotektinvärden över 160 µg/g

Fekala kalprotektinvärden över 160 µg/g talar för neutrofilinfiltrat i mag-tarmkanalen. Därför kan detta signalera närvaron av aktiv inflammatorisk sjukdom. Lämpliga, ytterligare utredningsprocedurer av specialister föreslås för att fastställa en övergripande klinisk diagnos.

Klinisk utvärdering

Förmågan hos det utökade Quantum Blue® fCAL- testet att skilja mellan patienter med IBD och andra icke-inflammatoriska GI-störningar, inklusive IBS, utvärderades med hjälp av kliniska prover som samlats in från 278 patienter och extraherats med CALEX® Cap-enheten. Ett hundra tjugofyra (124) patienter hade en slutlig diagnos IBD (Crohns sjukdom, ulcerös kolit eller obestämd kolit), 92 patienter led av IBS och 62 patienter hade buksmärta och/eller diarré, eller annan gastrointestinalt relaterade icke-inflammatoriska tillstånd (se Tabell 5). Den slutliga diagnosen stöddes av endoskopiska såväl som andra kliniska fynd.

En klinisk sensitivitet på 91,9 % vid 80 µg/g och en klinisk specificitet på 78,6 % vid 160 µg/g, kan uppnås i differentieringen mellan IBD och GI-relaterade icke-inflammatoriska tillstånd, inklusive IBS. ROC-kurvanalys ledde till en AUC på 0,901 (se Tabell 6).

En klinisk sensitivitet på 91,9 % vid 80 µg/g och en klinisk specificitet på 80,4 % vid 160 µg/g, kan uppnås i differentieringen mellan IBD och IBS. ROC-kurvanalys ledde till en AUC på 0,913 (se Tabell 7).

Den optimala tröskelvärdeskombinationen för dessa patientpooler skulle kunna definieras genom ROC-analys vid 80 µg/g och 160 µg/g kalprotektin, vilket är något strängare än en kombination av **ett känsligare, lägre tröskelvärde på 50 µg/g** med lägre prestanda i specificitet och **ett övre tröskelvärde på 200 µg/g** med något lägre känslighet (Tabell 8 och 9).

II. IBD-övervakning

Kliniska tröskelvärden

Bestämningen av fekalt kalprotektin är också ett pålitligt och enkelt sätt att hjälpa till att övervaka IBD-patienter (ref. 7-18).

Resultatkategorierna som visas är rekommendationer och deras fastställande baseras på kunskap om publicerade tröskelvärden och studier av klinisk prestanda. Det rekommenderas att läkare fastställer individuella patienttröskelvärden genom att bestämma patientens baslinjenivå av kalprotektin under sjukdomsremission.

Kalprotektinvärden under 100 µg/g:

Nivåer av fekalt kalprotektin under 100 µg/g kan på ett tillförlitligt sätt indikera patienter, med låg risk för kliniskt återfall, i endoskopisk remission, för vilka invasiva endoskopiska procedurer kan undvikas (ref. 7-18).

Kalprotektinvärden mellan 100 och 300 µg/g:

Nivåer av fekalt kalprotektin mellan 100–300 µg/g kan tala för behov av tätare kontroll under följande period, för att bedöma tendenser till sjukdomsutveckling.

Kalprotektinvärden över 300 µg/g

Nivåer av fekalt kalprotektin över 300 µg/g bör upprepas och, om förhöjda nivåer bekräftas, ge stöd till ytterligare utredningsprocedurer (ref. 7-18).

Klinisk utvärdering

Korrelation mellan kalprotektinnivåer och inflammatorisk status i patienters tarmslemhinna, enligt endoskopiska utvärderingar, bestämdes i tre oberoende studier med BÜHLMANN kalprotektintester (Tabell 10). Det diagnostiska värdet av kalprotektin för att förutsäga klinisk remission och återfall, enligt patientens symtom, kliniska aktivitetsindex, oplanerat behov av upptrappning av behandling, sjukhusvistelse eller nödfall, bestämdes i tre studier med användning av BÜHLMANN kalprotektin-tester (Tabell 11).

PRESTANDAEGENSKAPER

De presenterade prestandaegenskaperna har fastställts på Quantum Blue® Reader 3e generationen, med undantag för linjäritet, som presenteras för båda avläsargenerationerna.

Quantum Blue® fCAL extended validerades på både Quantum Blue® Reader 2a och 3e generationens instrument. De angivna prestandaegenskaperna gäller båda generationer av avläsare.

Metodjämförelse

Bias vid kliniska beslutspunkter och genomsnittlig bias: ≤15 %:

Metodjämförelsestudien utfördes enligt CLSI-riktlinjen EP09-A3. Etthundraåttiotre (183) avföringsprover, som extraherats med CALEX® Cap-enheten, mättes under 10 dagar med tre olika lotter av Quantum Blue® fCAL extended reagens. Referensvärden, med ett intervall för kalprotektinkoncentration på 30,5 till 925,8 µg/g, fastställdes i en klinisk studie med BÜHLMANN fCAL® ELISA, med hjälp av den manuella vägnings- och extraktionsmetoden. Resultaten sammanfattas i Tabell 12 och 13.

Noggrannhet/recovery: inom 80 % till 120 %

Åtta extrakt av avföringsprov spikades med 60,2 µg/g och 120,4 µg/g kalprotektin i kalibratormaterial av avföringsextrakt, med 5 % respektive 10 % av provextraktvolymen. "Baslinje"-prover spikades med motsvarande volym extraktionsbuffert. "Baslinje"- och "baslinje + spik"-prover mättes i 13 replikat. Resultaten sammanfattas i Tabell 14.

Repeterbarhet: ≤25 % CV

Precision inom laboratoriet: ≤25 % CV

Repeterbarhet och laboratorieprecision fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP05-A3, med användning av den standardiserade studieprotokollet 20 dagar x 2 körningar x 2 replikat. Sex poolade avföringsextrakt med kalprotektinkoncentrationer från 49,9 till 485,0 µg/g testades. Resultaten sammanfattas i Tabell 15.

Precision mellan partier: ≤25 % CV

Precision mellan olika lotter fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP05-A3, med användning av en studieprotokoll med 3 lotter x 5 dagar x 5 replikat. Sex poolade avföringsextrakt med kalprotektinkoncentrationer från 55,3 till 552,5 µg/g testades. Resultaten sammanfattas i Tabell 16.

Reproducerbarhet mellan instrument: ≤ 25 % CV

Precision mellan instrument fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP05-A3, med användning av en studieprotokoll med 3 instrument x 5 dagar x 5 replikat. Sex poolade avföringsextrakt med kalprotektinkoncentrationer från 48,5 till 502,8 $\mu\text{g/g}$ testades. Resultaten sammanfattas i Tabell 17.

Detektionsgräns (LoD): ≤ 30 $\mu\text{g/g}$

LoD fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP17-A2 med den klassiska metoden, parametrisk analys och en LoB < 20 $\mu\text{g/g}$, bestämd med hjälp av en icke-parametrisk analys.

Kvantifieringsgräns (LoQ): ≤ 30 $\mu\text{g/g}$

LoQ fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP17-A2, baserat på 90 bestämningar och ett precisionsmål på 25 % CV.

Linearitet: 25,2 till 908,9 $\mu\text{g/g}$

Det linjära området för Quantum Blue® fCAL extended bestämdes enligt CLSI-riktlinjen EP06-A. Mätningar utfördes i 10 replikat på totalt fyra reagenslotter. En maximal avvikelse från lineariteten, på 20 % eller 15 $\mu\text{g/g}$, för prover under 75 $\mu\text{g/g}$, tillåts. Resultaten sammanfattas i Tabell 18.

High dose hook-effekt

High dose hook-effekttestning utfördes på två reagenslotter. Prover med kalprotektinkoncentrationer upp till 5 000 $\mu\text{g/g}$ indikerades korrekt som över 1 000 $\mu\text{g/g}$ för alla replikat. För prover med högre kalprotektinkoncentrationsvärden (6308,2 till 11214,4 $\mu\text{g/g}$), observerades replikat med värden under 1000 $\mu\text{g/g}$ (643,4 $\mu\text{g/g}$ lägst).

PREANALYS

CALEX® Cap extraktionsreproducerbarhet ≤ 30 % CV

Extraktionsreproducerbarheten fastställdes enligt CLSI-riktlinjen EP05-A3 med hjälp av studieprotokoll med 2 dagar x 2 operatörer x 3 CALEX® Cap-lotter x 2 extraktioner x 3 replikat. Åtta poolade kliniska avföringsprover med kalprotektinkoncentrationer från 51,2 till 615,3 $\mu\text{g/g}$ analyserades. Resultaten sammanfattas i Tabell 19.

STÖRANDE ÄMNEN

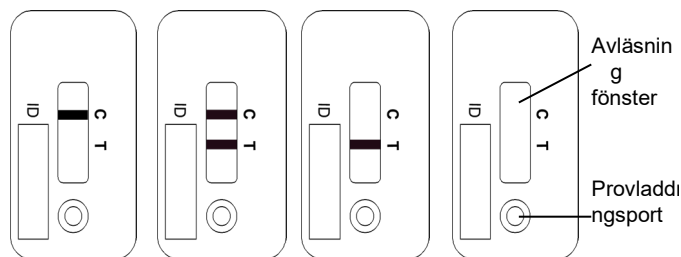
Mottagligheten av Quantum Blue® fCAL extended-analysen för orala läkemedel, näringstillskott, hemoglobin samt enteropatologiska mikroorganismer, utvärderades enligt CLSI-riktlinjen EP07-A2. Bias i resultat som överstiger 20 % ansågs som interferens.

Ingen interferens upptäcktes med angivna ämnen, i Tabell 20, upp till de angivna koncentrationerna.

Ingen interferens upptäcktes med enteropatologiska mikroorganismer, som anges i Tabell 21, upp till de angivna mängderna av kolonibildande enheter (CFU) per mL avföringsextrakt.

TABELLER OCH FIGURER

Testresultat



Figur 1A Figur 1B Figur 1C Figur 1D

Figur 1

Klinisk studie – att skilja organisk sjukdom från funktionell gastrointestinal sjukdom

Slutlig diagnos	Fördelning av patientresultat i antal (procent) inom Quantum Blue® fCAL utökade diagnostiska intervall			
	< 80 µg/g	80–160 µg/g	> 160 µg/g	Totalt
IBD	10 (8,1 %)	12 (9,7 %)	102 (82,3 %)	124
IBS	62 (67,4 %)	12 (13,0 %)	18 (19,6 %)	92
Annan GI	38 (61,3 %)	9 (14,5 %)	15 (24,2 %)	62

Tabell 5

IBD kontra icke-IBD	Klinisk beslutspunkt	
	80 µg/g	160 µg/g
Känslighet (95 % KI)	91,9 % (85,7 %, 96,1 %)	82,3 % (74,4 %, 88,5 %)
Specificitet (95 % KI)	64,9 % (56,8 %, 72,4 %)	78,6 % (71,2 %, 84,8 %)
PPV (95 % KI)	67,9 % (60,2 %, 74,8 %)	75,6 % (67,4 %, 82,5 %)
NPV (95 % KI)	90,9 % (83,9 %, 95,6 %)	84,6 % (77,6 %, 90,1 %)
ROC AUC (95 % KI)	0,901, (0,865, 0,938)	

Tabell 6

IBD kontra IBS	Klinisk beslutspunkt	
	80 µg/g	160 µg/g
Känslighet (95 % KI)	91,9 % (85,7 %, 96,1 %)	82,3 % (74,4 %, 88,5 %)
Specificitet (95 % KI)	67,4 % (56,8 %, 76,8 %)	80,4 % (70,9 %, 88,0 %)
PPV (95 % KI)	79,2 % (71,6 %, 85,5 %)	85,0 % (77,3 %, 90,9 %)
NPV (95 % KI)	86,1 % (75,9 %, 93,1 %)	77,1 % (67,4 %, 85,0 %)
ROC AUC (95 % KI)	0,913, (0,876, 0,950)	

Tabell 7

IBD kontra icke-IBD	Klinisk beslutspunkt	
	50 µg/g	200 µg/g
Känslighet (95 % KI)	96,0 % (90,8 %, 98,7 %)	79,0 % (70,8 %, 85,8 %)
Specificitet (95 % KI)	50,6 % (42,5 %, 58,8 %)	83,8 % (77,0 %, 89,2 %)
PPV (95 % KI)	61,0 % (53,8 %, 67,9 %)	79,7 % (71,5 %, 86,4 %)
NPV (95 % KI)	94,0 % (86,5 %, 98,0 %)	83,2 % (76,4 %, 88,7 %)

Tabell 8

IBD kontra IBS	Klinisk beslutspunkt	
	50 µg/g	200 µg/g
Känslighet (95 % KI)	96,0 % (90,8 %, 98,7 %)	79,0 % (70,8 %, 85,8 %)
Specificitet (95 % KI)	52,2 % (41,5 %, 62,7 %)	83,7 % (74,5 %, 90,6 %)
PPV (95 % KI)	73,0 % (65,5 %, 79,7 %)	86,7 % (79,1 %, 92,4 %)
NPV (95 % KI)	90,6 % (79,3 %, 96,9 %)	74,8 % (65,2 %, 82,8 %)

Tabell 9

icke-IBD-IBS + annan GI

KI – konfidensintervall

PPV – positivt prediktivt värde

NPV – negativt prediktivt värde

ROC AUC – area under mottagarens karaktäristiska funktionskurva

Kliniska studier – IBD-övervakning

Kalprotektin ¹ kontra IBD-aktivitet, fastställt av endoskopiska fynd	Studie 1 Spanien (ref. 9)	Studie 2 Spanien (ref. 10)	Studie 3 Australien, Nya Zeeland (ref. 11)
Patientnummer och demografi	89 (CD ²) Ålder: 32–58 44 % man	123 (UC ³) Ålder: 18–85 66,4 % man	99 (CD ²) efter resektion Ålder: 29–47 46,5 % man
Tröskelvärde	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
NPV	98 %	86 %	91 %
PPV	76 %	80,3 %	53 %

Tabell 10

¹ Studie 1 och 2 – Quantum Blue® fCAL och Quantum Blue® fCAL high range

Studie 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

² CD = patienter med Crohns sjukdom

³ CD = patienter med Ulcerös kolit

Kliniska studier – IBD-övervakning

Kalprotektin ¹ kontra framtida klinisk remission eller återfall	Studie 4 Storbritannien (ref. 12)	Studie 5 Spanien (ref. 13)	Studie 6 Spanien (ref. 14)
Patientnummer och demografi	92 (CD ²) 38 % man	30 (CD ²) adalimumab-behandling Ålder: 24–64 43,3 % man	33 (CD ²) 20 (UC ³) infiximab-behandling Ålder: 18–68 47,2 % man
Uppföljningstid efter kalprotektinmätning	12 månader	4 månader	12 månader
Patienter med kliniskt återfall efter uppföljning	11 %	30 %	23 %
Tröskelvärde	240 µg/g	204 µg/g	160 µg/g
NPV	96,8 %	100 %	96,1 %
PPV	27,6 %	75 %	68,7 %

Tabell 11

¹ Studie 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

Studie 5 och 6 – Quantum Blue® fCAL och Quantum Blue® fCAL high range

² CD = patienter med Crohns sjukdom

³ CD = patienter med Ulcerös kolit

TABELLER OCH FIGURER

Metodjämförelse

Passing-Bablok regressionsanalys						
Lutning (95 % KI)	Skärning [$\mu\text{g/g}$] (95 % KI)	Bias vid 80 $\mu\text{g/g}$ (95 % KI)	Bias vid 100 $\mu\text{g/g}$ (95 % KI)	Bias vid 160 $\mu\text{g/g}$ (95 % KI)	Bias vid 300 $\mu\text{g/g}$ (95 % KI)	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

Tabell 12

Bland-Altman-analys		
Genomsnittlig bias (95 % KI)	Lägre LoA (95 % KI)	Övre LoA (95 % KI)
9,7 % (4,9 %, 14,5 %)	-54,6 % (-62,8 %, -46,4 %)	74,0 % (65,8 %, 82,2 %)

Tabell 13

Tillfrisknande

ID	Spikvärde [$\mu\text{g/g}$]	Genomsnittlig baslinje [$\mu\text{g/g}$]	Förväntad baslinje + spik [$\mu\text{g/g}$]	Observerad baslinje + spik [$\mu\text{g/g}$]	Återhämtningshastighet [%]
nr 1	60,2	52	112	110	99
nr 2	60,2	63	123	127	103
nr 3	60,2	63	123	131	107
nr 4	60,2	78	138	137	99
nr 5	60,2	115	175	179	102
nr 6	120,4	149	270	272	101
nr 7	120,4	221	341	341	100
nr 8	120,4	469	589	559	95

Tabell 14

Precision inom laboratoriet

ID	Genomsnitt [$\mu\text{g/g}$]	n	Inom körning (Repetierbarhet) % CV	Mellan körning % CV	Mellan dagar % CV	Total precision % 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

Tabell 15

Precision mellan partier

ID	Genomsnitt [$\mu\text{g/g}$]	n	Inom körning (Repetierbarhet) % CV	Mellan dagar % CV	Mellan partier % CV	Total precision % 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

Tabell 16

Precision mellan instrument

ID	Genomsnitt [$\mu\text{g/g}$]	n	Inom körning (Repetierbarhet) % CV	Mellan dagar % CV	% CV mellan instrument	Total precision % 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

Tabell 17

Linearitet

Spädningsserier	Parti	Mättningsintervall [$\mu\text{g/g}$]	R2	p-värde för icke-linjär koefficient	Linjärt område [$\mu\text{g/g}$]
1	M0527	15,5 till 939,1	0,911	<0,0001*	15,5 till 939,1
2	M2128	16,1 till 908,9	0,927	<0,0001*	25,2 till 908,9
3	M3048	11,7 till 972,9	0,856	0,018*	11,7 till 972,9
4	M4851	24,3 till 1004,2	0,939	<0,0001*	24,3 till 1004,2

Tabell 18: *signifikant

Pre-analytisk extraktionsreproducerbarhet

ID	Genomsnitt [$\mu\text{g/g}$]	n	Inom körning % CV	Mellan				Totalt % CV
				extraktion % CV	dag % CV	parti % CV	operator % 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

Tabell 19

TABELLER OCH FIGURER

Störande ämnen

Handelsnamn	Aktiv komponent	Koncentration mg/50 avföring mg
Duofer Fol	Järn- (II) sulfat (innehåller 0,4 mg folsyra)	0,11
Prednison	Prednison	0,31
Imurek	Azatioprin	0,19
Salofalk	Mesalamin; 5-ASA	5,21
Agopton	Lansoprazol	0,18
Asacol	Mesalamin; 5-ASA	2,50
Vancocin	Vancomycin	2,00
Bactrim	Sulfametoxazol + trimetoprim	1,7 + 0,35
Ciproxin	Ciprofloxacin	1,25
Vitamin E	DL- α -Tokoferolacetat	0,30
Berocca	B1 (1,4 mg), B2 (1,6 mg), B6 (2 mg), B12 (1 μ g), C (60 mg), folsyra (200 mg), nikotinamid (18 mg), pantotensyra (6 mg), biotin (0,15 mg), kalcium (120 mg), magnesium (120 mg), zink (9,5 mg)	1,06
Hemoglobin	Hemoglobin	1,25

Tabell 20

Namn	Slutlig koncentration (CFU/mL)
<i>Escherichia coli</i>	2,9 x 10 ⁶
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	8,2 x 10 ⁶
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. lunginflammation</i>	4,5 x 10 ⁶
<i>Citrobacter freundii</i>	5,5 x 10 ⁶
<i>Shigella flexneri</i>	5,0 x 10 ⁶
<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i>	5,3 x 10 ⁶

Tabell 21

REFERENSER

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. Ferreiro-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. Ferreiro-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. Lasson 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)

ÄNDRINGSLOGG

Datum	Version	Ändra
2022-07-13	A4	Uppdatering av kapitel <i>Lagring och hållbarhet för reagenser</i> Uppdatering av kapitel <i>Kompletterande reagens och material som medföljer</i> Uppdatering till kapitlet <i>Försiktighetsåtgärder</i> Uppdatering till kapitlet <i>Standardisering</i> Uppdatering till <i>Begränsning</i> angående high dose hook-effekt Uppdatering till data med <i>Klinisk prestanda</i> i kapitel <i>Skilja organisk sjukdom från funktionell gastrointestinal sjukdom, Klinisk utvärdering</i> Uppdatering av prestandadata i kapitlet <i>Prestandaegenskaper</i> Inledning av kapitel <i>Störande ämnen</i> Revision av kapitlet <i>Symboler</i> Inklusion av anmält organs nummer till CE-märkning – förfarande för bedömning av överensstämmelse enligt IVDR 2017/746

INCIDENTRAPPORTERING I EU:S MEDLEMSLÄNDER




Om någon allvarlig incident i samband med denna enhet har inträffat, ska detta rapporteras utan dröjsmål till tillverkaren och behörig myndighet i ditt medlemsland.

FRAKTSKADA

Meddela in distributör om denna produkt mottogs skadad.

SYMBOLER

BÜHLMANN använder symboler och tecken som anges och beskrivs i ISO 15223-1. Dessutom används följande symboler och tecken:

Symbol	Förklaring
	Testkassett
	Extraktionsbuffert
	Kontroll Låg
	Kontroll Hög
	RFID-chipkort
	Strekkodskort

Delar av kitet är patentskyddade av EP2947459(B1); US10620216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2)

