

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

Folheto Informativo Internacional do Ensaio para IgE Específica de Alergeno CLA®



Para utilização única em diagnóstico *in vitro*

Doc.No. 0625-08
Rev.: 05
Rev. Date: 0209

1 Uso Pretendido

O teste CLA® para a detecção de IgE específica a alérgenos é um teste “*in vitro*” para usar na determinação semiquantitativa das concentrações de IgE específica de alérgenos em soro humano.

2 Resumo e Explicação do Teste

Alergia atópica é um quadro de hipersensibilidade imunológica mediada por uma classe distinta de anticorpos séricos denominados reaginas, que foi identificada em meados dos anos sessenta como imunoglobulina E (IgE).^{1,2} Quando estimulados pelo alérgeno específico, os linfócitos B imunocompetentes produzem anticorpos IgE contra o alérgeno. O anticorpo IgE liga-se através da zona Fc a receptores de superfície dos mastócitos e dos leucócitos basófilos.³ A ligação subsequente do alérgeno à IgE ligada à superfície celular, activa desgranulação da célula e o lançamento das aminas vasoativas que causam contrações do músculo liso, prurido, inchaço, e libertação através das mucosas de fluido extracelular. As manifestações clínicas mais comuns do processo biológico são febre do feno, asma, dermatite, urticária, e choque anafilático. O doseamento do nível da IgE para vários alérgenos no doente constitui um passo importante no diagnóstico e tratamento da alergia atópica.^{4,5}

O teste CLA para IgE específica a alérgenos é baseado na modificação não isotópica do método do RAST original e permite determinações simultâneas para diversos níveis de IgE específica de vários alérgenos.⁶ Os resultados são semi quantitativos, usando um sistema de classificação semelhante ao do RAST. Em todos os painéis de alérgeno CLA são incorporados controlos internos que avaliam o desempenho do ensaio e compensam ligações inespecíficas no soro. O ensaio de IgE específica para o alérgeno CLA combinou a especificidade e sensibilidade dos métodos do RAST com a conveniência e simplicidade de determinação simultânea de testes não-isotópicos múltiplos de alérgenos.⁷

3 Principio do Procedimento

O ensaio de IgE específica de alérgeno CLA emprega um dispositivo pequeno de plástico, parecido com uma pipeta, conhecido como uma câmara de teste, para expor o soro do doente, simultaneamente a vários alérgenos ou misturas de alérgenos. A câmara de teste contém segmentos pequenos segmentos de fio de celulose, cada uma com o alérgeno ou mistura de alérgenos ligado através de uma ligação covalente. Cada pipeta também contém um Controlo Negativo (branco) e um Controlo Positivo do procedimento.

O ensaio de IgE específica de alérgeno CLA é realizado enchendo uma câmara de teste com soro. Durante a incubação, a IgE sérica liga-se ao alérgeno que recobre os fios de celulose. A câmara é lavada com tampão para remover componentes de soro que não foram ligados ao fio. A câmara é enchida com enzima que se liga com a IgE sérica já ligado ao fio de celulose. Depois de uma segunda lavagem, a câmara é enchida com uma mistura de fotoreagentes que reage com o anticorpo para produzir quimioluminescência. A quantidade de luz emitida por cada fio é directamente propor-

cional à quantidade de IgE específica de alérgeno contida no soro do doente.

4 Reagentes / Componentes

Ensaio de IgE específica de alérgeno CLA® *

Conserve a 2-8°C durante o prazo de validade. Não congele.

<u>Componente e Descrição</u>	<u>Cada kit de 20 testes inclui</u>
Câmaras de teste Alérgenos específicos ou misturas de alérgenos ligados por ligação covalente a fios de celulose.	20 câmaras de teste
Solução tampão de Lavagem (Concentrado) Depois de diluído a solução contém: Soro fisiológico com tampão fosfato 0,01M, Tween 20 0,01%, azida de sódio 0,001%	2 frascos, 50 ml cada
Anticorpo IgE Solução azul composta por: Anticorpo de cabra marcado com enzima anti-IgE humana Soro fisiológico com tampão fosfato 0,01M pH 7,2, estabilizantes de proteínas, Proclin®0,1% como conservante	1 frasco, 32 ml
Fotoreagente A Solução contendo: 3-aminofthadrazida 14-30 mM (luminol)	1 frasco, 8ml
Fotoreagente B Solução contendo: Tampão borato 0,05M, pH 9,4	1 frasco, 8ml
Fotoreagente C Solução vermelha contendo: Laranja de etilo 0,0025M	1 frasco, 8ml
Fotoreagente D Solução contendo: Peróxido de hidrogénio 0,004M	1 frasco, 8ml
Rolhas Pretas para as câmaras de teste Rolhas para a parte superior das câmaras de teste	22 rolhas
Rolhas Brancas para as câmaras de teste Rolhas para a parte inferior das pipetas	22 rolhas

*O kit está disponível em várias configurações. Contactar o representante de Hitachi Chemical Diagnostics para informações.

5 Precauções

- O ensaio de IgE específica de alérgeno CLA destina-se a ser utilizado em diagnóstico “*in vitro*”.
- O concentrado da solução de lavagem contém azida de sódio como conservante. Foi documentado que a azida de sódio reage com chumbo ou cobre nos canos para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Como tal, a eliminação deste reagente deverá ser cuidadosa, devendo enxaguar-se sempre com um volume adequado de água para prevenir a formação de azidas metálicas no sistema de canalização.⁸
- Não utilizar os componentes do kit depois da data de validade, indicada em cada componente.
- Os reagentes do ensaio de IgE específica de alérgeno CLA são fornecidos em conjunto. Não misturar reagentes de um kit com outros de kits de lotes diferentes.
- Foi documentado que contaminação com lixívia interfere com o teste.

6 Preparação dos Reagentes

Tampão de lavagem:

- O concentrado do Tampão de Lavagem deve atingir a temperatura ambiente. Certifique-se de que todos os cristais de sal dissolveram. Se existirem cristais remanescentes, coloque o frasco, firmemente fechado, numa proveta de água morna até que todos os cristais dissolvam.
- Enxagúe o frasco da solução tampão de lavagem e a tubagem com água destilada.
- Com suavidade, inverta o frasco do concentrado da solução de lavagem várias vezes para misturar.

- Diluir a solução de lavagem (50 ml) com 950 ml de água destilada ou desionizada numa proveta ou copo graduado de 1 litro. Misturar completamente.
- Transferir para o frasco dispensador de tampão de lavagem.
- Uma vez preparado o tampão é estável durante 1 mês quando armazenado à temperatura ambiente (20-25°C) ou refrigerado (2-8°C).

Anticorpo:

- Deixar o anticorpo atingir a temperatura ambiente antes de o usar.
- Com suavidade inverte o frasco do anticorpo antes de o usar.
- O anticorpo é estável até à data indicada no rótulo se conservado sob refrigeração (2-8°C) enquanto não utilizado.

NOTA: Um frasco de anticorpo é suficiente para vinte (29) câmaras de teste de 36 alérgenos.

Mistura de Fotoreagentes

Preparar os fotoreagentes imediatamente antes da sua utilização.

- Deixar os fotoreagentes A, B, C, e D atingir a temperatura ambiente.
- Usando uma micropipeta com pontas descartáveis, misture **partes iguais** do fotoreagente A, B, C e D num pequeno recipiente. É necessário um volume mínimo de **350µl** de cada reagente é requerido por câmara de teste, ou seja, **1,4 ml** de mistura de fotoreagentes por teste.

NOTA: Para evitar contaminação de reagentes, use uma ponta descartável nova para cada fotoreagente.

- Com suavidade rode o recipiente para misturar o reagente.

NOTA: A mistura deve ser usada nos 60 minutos após a sua preparação.

7 Instruções de Armazenamento

- Conserve os componentes do kit a 2-8°C. Quando armazenados como indicado, os componentes podem ser usados até à data indicada nos rótulos de cada componente.
- Não congele os componentes do kit.
- As câmaras de teste são acondicionadas num saco de plástico com uma esponja húmida. Verifique que o saco está correctamente fechado antes e depois da utilização. Se a esponja ficar seca, humedecer com tampão de lavagem e fechar novamente o saco. Quando armazenadas no saco fechado a 2-8°C as câmaras de teste podem ser usadas até à data indicada no rótulo.
- Não utilizar os componentes do kit caso existam sinais de deterioração. Os sinais de deterioração incluem um odor pouco comum, trucação e outras indicações de contaminação.

8 Colheita e Preparação das Amostras

Manusear todas as amostras dos doentes e os componentes do kit como recomendado para qualquer amostra de sangue humano potencialmente infecciosa. Siga as Precauções Universais ou outras orientações da instituição.

O volume mínimo de soro humano requerido para cada teste é o seguinte:
Uma câmara de teste **para 36 alérgenos** 1,4ml de soro.
Uma câmara de teste de 16 ou menos alérgenos, 0,8ml de soro.

O protocolo seguinte deve ser usado para colheita, preparação e armazenamento do soro para teste alergia CLA:

1. Colher uma amostra de sangue venoso para um tubo separador de soro de 10 ml, ou para um tubo de tampa vermelha. Não é necessário que o doente esteja em jejum. Não são necessárias nenhuma preparação especiais.

NOTA: Soro hemolisado ou lipémico podem afectar adversamente o desempenho do ensaio de IgE específica de alérgeno CLA.

2. Permitir a coagulação do sangue no tubo durante **1 hora** a temperatura ambiente.
3. Centrifugar o sangue coagulado durante 10 a 20 minutos a 2000-3000 x g ou 2500-3600 rpm.
4. Transferir o soro para um tubo novo de plástico, com identificação apropriada.

5. As amostras de soro podem ser armazenadas durante uma semana a 2-8°C. Para períodos mais longos, congelar as amostras a -20°C.

NOTA: Evitar congelar e descongelar repetidamente as amostras. Misturar completamente as amostras depois de descongeladas, antes de centrifugar.

9 Procedimento do Ensaio

Consultar o manual “User Guide and Procedural Manual” para instruções completas na operação do ensaio.

Materiais Incluídos:

Kit do **ensaio de IgE específica de alérgeno CLA** (ver secção 4 REAGENTES/COMPONENTES)

Material Necessário Mas Não Incluído

- Kit de equipamento CLA, incluindo:
 - Suporte para até 40 câmaras de teste
 - Depósito para o esgoto
 - Frasco dispensador para o tampão de lavagem
 - Micropipeta e pontas
 - Recipientes descartáveis, 50 ml
 - Seringa de 3cc
- Proveta ou frasco graduado, 1L para preparar o tampão de lavagem
- Água desionizada ou destilada
- Tubos de colheita separadores de soro ou com tampa vermelha, 10 ml
- Centrífuga com capacidade de 2000-3000 x g ou 2500-3600 rpm
- Tubos de ensaio de plástico para preparação das amostras
- Toalhas de papel absorventes
- Papel sem fibras
- Aparelho CLA 1 Luminometer

Preparação das pipetas e das Amostras dos Doentes

1. Re-centrifugar os soros durante 10-20 minutos a 2000-3000 x g ou 2500-3600 rpm imediatamente antes de uso.

NOTA: O uso do travão da centrífuga pode desalojar o sedimento e resultar em leituras elevadas para o branco e resultados incorrectos. Desactivar o travão da centrífuga antes de centrifugar os soros.

2. Retirar as câmaras de teste (uma por amostra) do saco de plástico. Fechar o saco e recolocar no frigorífico.
3. Limpar a humidade do exterior da câmara de teste.
4. Com a grelha colorida virada para baixo, marcar cada câmara de teste com a identificação do doente..
5. Registrar o número de lote do kit, o número de lote do painel, e identificações doentes.
6. Bater cuidadosamente a câmara de teste contra papel absorvente para remover qualquer líquido residual dentro da câmara.

Procedimento

A. Encher a câmara de teste de soro

1. Fixar a seringa de 3cc à parte superior da câmara de teste.
2. Inserir a ponta da seringa na amostra. **Evitar qualquer precipitado e/ou camada lipídica.**
3. Lentamente puxar o êmbolo da seringa para aspirar o soro até cobrir completamente o último fio. **Confirmar que o último fio está completamente coberto. Isto evita a formação de bolhas que podem interferir com os resultados do teste.**

B. Tapar e incubar as câmaras de teste

1. Com a seringa ainda fixa à parte superior da câmara de teste, colocar a borracha branca na parte inferior da câmara de teste.
2. Retirar a seringa e colocar a borracha preta na parte superior da câmara de teste.

Nota: As borrachas devem ser empurradas completamente para evitar derrames.

3. Colocar as câmara de teste no suporte (workstation).
4. Incubar 16-24 horas à temperatura ambiente, registando a hora de início da incubação.

C. Preparar o tampão de lavagem como indicado na Secção 6, PREPARAÇÃO DO REAGENTE.

D. Escoar o soro

1. Retirar a borracha inferior de cada câmara de teste e colocar novamente no suporte.
2. Retirar a borracha superior de cada câmara de teste e deixar escoar para o depósito. Anotar a hora final de incubação.

E. Lavagem das câmaras de teste

1. Preencher o circuito do frasco dispensador do tampão de lavagem com tampão até todas as bolhas de ar saírem.
2. Fixar a abertura do tubo do frasco dispensador do tampão de lavagem à parte superior da primeira câmara de teste.
3. Lavar sequencialmente cada câmara de teste uma vez com 10ml solução premindo moderadamente uma vez a bomba do frasco dispensador.

NOTA: Deixar cada câmara de teste escoar completamente antes de continuar com o próximo passo.

4. Repetir Passo 3 mais duas vezes para um total de três lavagens.

NOTA: Depois da lavagem as câmaras de teste devem ser enchidas imediatamente com o anticorpo para evitar que os fios sequem.

F. Encher câmaras de teste de anticorpo

1. Bater a ponta da câmara de teste em papel absorvente para remover qualquer resíduo de tampão de lavagem do interior da câmara de teste.
2. Fixar a seringa de 3cc à parte superior da câmara de teste.
3. Inserir a ponta inferior da câmara de teste no anticorpo. Utilizar um recipiente descartável.
4. Puxar lentamente o êmbolo da seringa para aspirar o anticorpo até cobrir completamente o último fio.

NOTA: última fileira está completamente coberto de anticorpo. Isto evita a formação de bolhas que podem interferir com os resultados do teste.

G. Tapar e incubar as câmaras de teste

1. Com a seringa ainda fixa à parte superior da câmara de teste, colocar a borracha branca na parte inferior da câmara de teste.
2. Retirar a seringa e colocar a borracha preta na parte superior da câmara de teste.
3. Colocar as câmaras de teste no suporte (workstation). Incubar durante 4 horas \pm 15 minutos à temperatura ambiente (registrar a hora de início de incubação).

H. Escoar o anticorpo

1. Retirar a borracha inferior de cada câmara de teste e colocar novamente no suporte.
2. Retirar a borracha superior de cada câmara de teste e deixar escoar para o depósito. Anotar a hora final de incubação.

I. Lavar as câmaras de teste 3 vezes como indicado nos passos E1 a E4.

J. Preparar a mistura de fotoreagentes como indicado na Secção 6, PREPARAÇÃO DE REAGENTES.

NOTA: Depois da lavagem, as câmaras de teste devem ser enchidas imediatamente com a mistura de fotoreagentes para evitar que os fios sequem.

K. Encher câmaras de teste com mistura de fotoreagente

1. Bater a ponta da câmara de teste em papel absorvente para remover qualquer solução de lavagem residual dentro da câmara de teste.
2. Fixar a seringa de 3cc à parte superior da câmara de teste.
3. Inserir a ponta inferior da câmara de teste no fotoreagente.
4. Puxar lentamente o êmbolo da seringa para aspirar o fotoreagente até encher **completamente** a câmara de teste, para evitar a formação de bolhas que podem interferir com os resultados do teste.

L. Colocar as borrachas

1. Com a seringa ainda fixa à parte superior da câmara de teste, colocar a borracha branca na parte inferior da câmara de teste.
2. Retirar a seringa e colocar a borracha preta na parte superior da câmara de teste.
3. Verificar que não existe líquido derramado.
4. Limpar qualquer reagente existente no exterior das câmaras de teste com um pano limpo sem fibras húmido.

M. Incubar as câmaras de teste 10 minutos antes de fazer a leitura no “Luminometer”. A leitura deve ser efectuada nos 60 minutos subsequentes à introdução do fotoreagente.

N. Para fazer a leitura, consultar o manual, “User Guide & Procedural Manual”

10 Controlo de Qualidade

A. Linhas dos Controlos Internos

Cada câmara de teste contém um Controlo Positivo do Procedimento e um Controlo Negativo (branco). Estes fios funcionam como indicadores internos para cada câmara de teste.

Controlo Positivo do Procedimento: verifica o desempenho dos reagentes do kit. Este tem que gerar uma leitura maior que ou igual a 243 LUs no CLA-1.

Controlo Negativo (Branco): compensa qualquer reacção não específica de IgE pode acontecer. Este tem que gerar uma leitura menor 33 LUs no CLA-1.

Resultados Inaceitáveis dos Controlos Internos: Se um resultado para qualquer controlo interno não está dentro dos limites acima definidos, o operador deverá:

- Reposicionar as câmaras de teste na cassete e repetir a leitura.
- Se os resultados continuarem inaceitáveis, consultar as Secções 6 e 7 do Manual (*User Guide & Procedural Manual*)

B. Controlos de Soro IgE Positivo e Negativo

Hitachi Chemical Diagnostics recomenda que cada kit de novo lote seja testado com dois níveis de controlos: Soro de Controlo Positivo e Soro de Controlo Negativo. Para instruções de utilização e aceitabilidade dos resultados, consultar o folheto informativo incluído no kit. As autoridades regulamentares podem requerer o uso mais frequente de controlos. Confirmar os requisitos locais junto da entidade regulamentar.

11 Resultados

O CLA-1 Luminometer mede a quantidade de luz emitida pelos fios nas câmaras de teste. O luminómetro mede a emissão em unidades de luminiscência (LU). Para calcular a resposta dos doentes em IgE, o instrumento automaticamente subtrai o nível de emissão do fio do controlo negativo ao nível de emissão de cada fio de IgE específica. Atribuem-se valores para as classes do sistema CLA de pontuação de alergia do Ensaio de IgE Específica de alergeno CLA. A quantidade de IgE associada com os valores das Classes CLA e das leituras no aparelho são apresentadas na tabela seguinte.

Classe CLA	LU's	Concentração de IgE específica
4	>242	Muito elevada
3	143-242	Elevada
2	66-142	Moderada
1	27-65	Baixa
1/0	12-26	Muito baixa
0	0-11	Não detectável

Valores de classe de 1/0 ou superior representam concentrações progressivamente crescentes de anticorpos específicos de alergenios. A Classe 0 representa uma ausência ou um nível não detectável de anticorpos específicos de alergenios.

12 Limitações do Procedimento

- Soro hemolizado ou lipémico pode afectar o desempenho do ensaio.
- O diagnóstico clínico definitivo e/ou dosagens para imunoterapia não devem ser fundados somente nos resultados de um único teste de diagnóstico, devendo ser feitos pelo médico depois de avaliar todos os dados clínicos e laboratoriais.
- O resultados do ensaio de IgE Específica de alergeno CLA são semi-quantitativos. O método não tem nenhum padrão absoluto e os níveis de classificação foram definidos arbitrariamente.
- Como a capacidade que ligação do anticorpo IgE específico pode variar de alergeno para alergeno, classificações semelhantes de alergenios diferentes não implicam necessariamente equivalência clínica.
- Quando aplicado a alergias alimentares, o teste pode não detectar anticorpos circulantes de IgE se eles forem dirigidos a formas al-

teradas dos alérgenos (como cozidos, processados, ou digeridos) e as formas alteradas não estão presentes na mesma forma destes alérgenos neste teste. Falsos positivos poderão ocasionar uma restrição dietética imprópria em pessoas testadas para alergias alimentares, enquanto falsos negativos em pessoas sensíveis podem resultar em reações anafiláticas de severidade variada.

- No teste de alergia a agentes inalados, falsos positivos podem provocar a administração de medicamentos impróprios. Falsos negativos podem resultar em falta de tratamento médico apropriado.
- Com níveis de IgE total superiores ou iguais a 500 UI/ml, deve interpretar-se cautelosamente um resultado um nível baixo de resposta para a IgE específica de alérgeno.
- Quando o procedimento do ensaio é seguido de acordo com as instruções do produto e a são seguidos os procedimentos de bom controlo de qualidade, obtêm-se resultados fiáveis e reprodutíveis..
- Foi notado que contaminação com lixívia interfere com o teste. Material de laboratório descontaminado com lixívia deve ser enxaguado completamente com água destilada ou desionizada.

NOTA: O uso de soluções de base alcoólica para desinfetar o suporte pode provocar o rachamento do plástico e inutilização precoce do suporte.

13 *Valores Esperados*

As classes CLA foram originalmente definidas por estudos científicos para estabelecer a curva de calibração usando soro com anticorpos de IgE específicos para videeiro branco. O valor de "cutoff" entre resultados positivos e negativos foi estabelecido estatisticamente em dois desvios padrão acima da média da população normal.⁶

É recomendado que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo de referência para a população de interesse.

14 *Características do Desempenho do Procedimento*

A. Precisão¹²

Intra-ensaio. Foi analisado um grupo de cinco replicados de quatro amostras de soro. O coeficiente de variação médio dos resultados de todos os alérgenos testados, quando calculados em LUs, foi 11,7% .

Inter-ensaios: Foram analisadas cinco replicados de quatro amostras de soro analisadas em quatro dias diferentes. O coeficiente de variação médio dos resultados de todos os alérgenos testados, quando calculados em LUs foi 11,6%.

B. Sensibilidade¹²

O limite de detecção do ensaio é 10 LUs.

C. Especificidade¹²

Não existem reações cruzadas com as imunoglobulinas IgA, IgM, IgG, ou IgD a níveis normais fisiológicos no soro humano.

D. Comparação de Métodos "In Vitro"¹²

Em média, a concordância (calculada como eficiência) entre cada alérgeno CLA e ensaios alternativos "in vitro" é de aproximadamente 95%, com um intervalo de concordância de 86% a 100%.

Nota: Para a grande maioria de alérgenos clinicamente significativos, não existem referências padrão de alérgenos para comparação entre métodos.

15 *Bibliografia*

1. Ishizaka K, Ishizaka T, Hombrook MM. *J Immunol* 1966;97:75.
2. Johansson SGO, Bennich H. *Immunol* 1967;13:381.
3. Kulczycki A. *J Allergy Clin Immunol* 1981;68:5.
4. Johansson SGO, Bennich HH, Berg T. *Prog Clin Immunol* 1972;1:157.
5. Homburger HA. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 1986;23:279.
6. Miller SP, Marinkovich VA, Riege DH, Sell WJ, et al. *Clin Chem* 1984;30:1467.
7. Agata H, et al. *Ann Allergy* 1993;70:153.
8. Safety Management No. CDC-22, *Decontamination of laboratory sink drains to remove azide salts*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control, April 30, 1976.
9. U.S. Dept. of Health and Human Services. Centers for Disease Control. Guidelines For Prevention of Transmission of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus to Health-Care and Public-Safety Workers. February 1989.
10. Richardson SH, Barkley WE, eds. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. 2nd ed. Washington, DC: US Dept of Health and Human Services, 1988.
11. Federal OSHA Standard 1910.1030. *Bloodborne pathogens*. 29 CFR 1910.1030.
12. Dados disponíveis a pedido

Para assistência técnica, contactar Hitachi Chemical Diagnostics. Fora dos Estados Unidos, contactar o seu representante local de Hitachi Chemical Diagnostics.

United States Office

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
630 Clyde Court
Mountain View, California 94043
Tel. (650) 961-5501
Fax (650) 969-2745

European Office and

EU Authorized Representative
Hitachi Europe Ltd.
Whitebrook Park
Lower Cookham Road
Maidenhead, Berkshire SL6 8YA
United Kingdom
44 (0) 1628 585 590

©2000, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
CLA é uma marca registada da Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

Fabricado sob uma ou mais das patentes do EUA seguintes: 3,941,876, 4,031,197, 4,459,360 (e patentes correspondentes concedidas no Canadá, Austrália, Japão, Espanha, França, Alemanha, Itália, Suécia, e Grã Bretanha), 4,510,393, 4,558,013, 5,567,149 (e patentes correspondentes concedidas no Canadá, Austrália, Japão, Espanha, França, Alemanha, Itália, Suécia, e Grã Bretanha), 4,568,184, 285,485, 4,743,541 (e patentes correspondentes concedidas no Canadá, Austrália, Japão, Espanha, França, Alemanha, Itália, Suécia, e Grã Bretanha), e 5,082,768 (e patente correspondente concedida no Japão).