

## 1 CONTENTS

Page no.

1 Intended use

2 Summary and explanation

3 Principle

4 Reagents

5 Caution

6 Storage and stability

7 Specimen collection and preparation

8 Methodology

9 Quality control

10 Limitations

11 Expected values

12 Performance characteristics

13 Bibliography

Deutsch

Français

Español

Siehe Seite

Cf. page

Página

## Freelite® Human Lambda Free kit for use on the Roche Cobas Integra®

For *in-vitro* diagnostic use

Product Code: LK018.RI

Product manufactured by:  
The Binding Site Group Ltd., 8 Calthorpe Road, Edgbaston, Birmingham B15 1QT, UK  
www.bindingsite.co.uk  
Telephone: +44 (0)121 456 9500  
Fax: +44 (0)121 456 9749  
e-mail: info@bindingsite.co.uk

In Europe and the USA, **Freelite®** is a registered trademark of The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK.  
Cobas Integra® is a registered trademark of the Roche group, Germany.

FDA (USA) Information  
Analyte Name Lambda Light Chains  
Complexity Cat. Moderate



### 1 INTENDED USE

This kit is intended for the quantitation of Lambda free light chains in serum on the Roche Cobas Integra 400 / 400plus and 800. Measurement of free light chains aids in the diagnosis and monitoring of multiple myeloma, lymphocytic neoplasms, Waldenström's macroglobulinemia, AL amyloidosis, light chain deposition disease and connective tissue diseases such as systemic lupus erythematosus in conjunction with other laboratory and clinical findings.

### 2 SUMMARY AND EXPLANATION

Immunoglobulin molecules consist of two identical heavy chains ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  or  $\mu$ ) which define the immunoglobulin class and two identical light chains ( $\kappa$  or  $\lambda$ ). Each light chain is covalently linked to a heavy chain and the two heavy chains are linked covalently at the hinge region. In healthy individuals, the majority of light chain in serum exists in this form, bound to heavy chain. However, low levels of free light chain (FLC) are found in serum of normal individuals due to the over-production and secretion of FLC by the plasma cells. Whilst the molecular weight of both light chains is  $\approx 22.5$  kD, in serum  $\kappa$  free light chain ( $\kappa$ -FLC) exists predominantly as monomer and  $\lambda$  free light chain ( $\lambda$ -FLC) as a covalently linked dimer with a molecular weight of  $\approx 45$  kD. This will lead to a differential glomerular filtration rate for  $\kappa$ -FLC and  $\lambda$ -FLC and may explain the observed ratio of  $\kappa$ -FLC to  $\lambda$ -FLC of 0.625 in serum compared to the ratio of bound  $\kappa$  to  $\lambda$  of 2.0. Elevated serum levels of monoclonal FLC are associated with malignant plasma cell proliferation (eg. multiple myeloma), AL amyloidosis and light chain deposition disease. Raised serum levels of polyclonal FLC may be associated with autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus <sup>(1-11)</sup>.

### 3 PRINCIPLE

Evaluating the concentration of a soluble antigen by turbidimetry involves the addition of the test sample to a solution containing the appropriate antibody in a reaction vessel or cuvette. A beam of light is passed through the cuvette and, as the antigen-antibody reaction proceeds, the light passing through the cuvette is scattered increasingly as insoluble immune complexes are formed. Light scatter is monitored by measuring the decrease in intensity of the incident beam of light. The antibody in the cuvette is in excess so the amount of immune complex formed is proportional to the antigen concentration. A series of calibrators of known antigen concentration are assayed initially to produce a calibration curve of measured light scatter versus antigen concentration. Samples of unknown antigen concentration can then be assayed and the results read from the calibration curve.

The sensitivity of turbidimetric assays can be increased by the use of particle enhancement <sup>(6)</sup>. This entails linking the antibody to a suitably sized particle that increases the relative light-scattering signal of the antigen-antibody reaction.

### 4 REAGENTS

- 4.1 Latex reagent:** consisting of monospecific antibody coated onto polystyrene latex. Preservatives: 0.05% ProClin™\*, 0.1% E-amino-n-caproic acid (EACA) and 0.01% benzamidine.
- 4.2 Standard and controls:** these consist of human sera that contain polyclonal Lambda free light chain. They are supplied in a stabilised liquid form and contain 0.099% sodium azide, 0.1% EACA and 0.01% benzamidine as preservatives.
- 4.3 Supplementary reagent:** containing 0.099% sodium azide as a preservative.

\*ProClin™ is a trademark of Rohm and Haas Corp., Philadelphia, PA.

### 5 CAUTION

All donors of human serum supplied in this kit have been serum tested and found negative for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to human immunodeficiency virus (HIV1 and HIV2) and hepatitis C virus. The assays used were either approved by the FDA (USA) or cleared for *in vitro* diagnostic use in the EU (Directive 98/79/EC, Annex II); however, these tests cannot guarantee the absence of infective agents. **Proper handling and disposal methods should be established as for all potentially infective material, including (but not limited to) users wearing suitable gloves, protective equipment and clothing at all times.** Only personnel fully trained in such methods should be permitted to perform these procedures.

This product contains sodium azide and ProClin 300 and must be handled with caution. Do not ingest or allow contact with the skin (particularly broken skin or open wounds) or mucous membranes. If contact does occur wash with a large volume of water and seek medical advice. Explosive metal azides may be formed on prolonged contact of sodium azide with lead and copper plumbing; on disposal of reagent, flush with a large volume of water to prevent azide build up.

This product should only be used by suitably trained personnel for the purposes stated in the Intended Use. Strict adherence to these instructions is essential at all times. Results are likely to be invalid if parameters other than those stated in these instructions are used.

Reagents from different batch numbers of kits are **NOT** interchangeable. If large numbers of tests are performed care should be taken to ensure that all the reagents are from the same batch.

## 6 STORAGE AND STABILITY

The unopened kit should be stored at 2-8°C and can be used until the expiry date shown on the kit box label. DO NOT FREEZE. The latex and supplementary reagent may be stored in the C-pack for up to three months on the analyser after opening. The standard and controls may be stored at 2-8°C for up to three months after opening providing precautions to prevent evaporation and contamination are taken.

## 7 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use fresh or deep frozen serum samples. Serum should be obtained by venepuncture, allowed to clot and the serum separated as soon as possible to prevent haemolysis. Samples may be stored at 2-8°C for up to 21 days, but for prolonged storage they should be kept frozen at -20°C or below. Repeated freeze/thaw cycles should be avoided. Microbially contaminated samples, samples containing particulate matter and lipaemic or haemolysed samples should not be used.

## 8 METHODOLOGY

Note: to enable full interpretation of results, free kappa/lambda ratios should be determined; samples must therefore also be assayed using Binding Site's **Freelite** Kappa Free kit (LK016.RI).

### 8.1 Materials provided

- 8.1.1 1 x 100 tests *Human Lambda Free Reagent (R2)*
- 8.1.2 1 x 100 tests *Lambda Free Supplementary Reagent (R1)*
- 8.1.3 2 x 2mL *Human Lambda Free Standard*
- 8.1.4 2 x 1.5mL *Human Lambda Free Control*
- 8.1.5 2 x 1.5mL *Human Lambda Free High Control*
- 8.1.6 1 x Roche blue opening tool
- 8.1.7 1 x Roche barcoded C-pack cassette

### 8.2 Transferring R1 and R2 into C-pack (see Figure 1).

- 8.2.1 Transfer the Lambda Free Reagent (R2) into position B (right-hand-side bottle as barcode faces user) and cap securely using Roche blue opening tool.
- 8.2.2 Transfer the Lambda Free Supplementary Reagent (R1) into position A (middle bottle) and cap securely using Roche blue opening tool.
- 8.2.3 Leave position C empty and without cap.

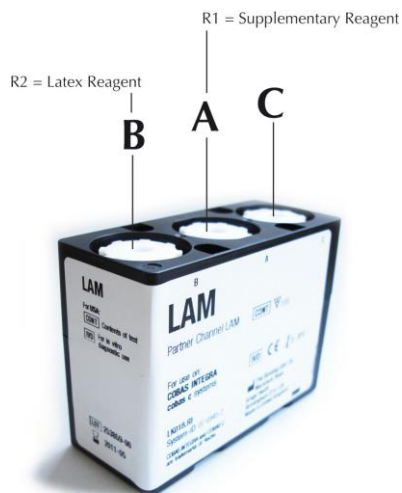


Figure 1: Transfer of reagents to C-pack.

**NB: Integra 800 only.** Once loaded onto the analyser, C-packs must remain on-board until all 100 tests have been used. Removal of C-packs before fully used will result in loss of remaining tests.

### 8.3 Materials required but not provided

- 8.3.1 Equipment for collection and preparation of test samples e.g. sample tubes (e.g. 650µL Cobas cup), centrifuge, etc.
- 8.3.2 A fully operational and equipped Integra 400/400plus/800 with NaCl Diluent 9% (Roche product code 20756350) loaded onto the ISE rack.
- 8.3.3 **Integra 800 only:** Cobas Integra Cleaner Cassette (CLEAN), Cat. No. 20764337, System ID 07 6433 7.

### 8.4 Test procedure

The user should be familiar with the operation of the Integra 400/400plus/800 analyser before attempting to carry out the test procedures. Ensure the most current TASU (Test Application SW Update) has been uploaded.

- 8.4.1 In order to avoid carry-over from other chemistries, **Freelite** tests must be batched together and run independently of other tests. A probe wash must be carried out prior to running in batch mode to remove any interfering substances that may affect the **Freelite** result.

On the Integra 800, ensure the following is set up on the **Freelite Kappa assay**

- a) Select Configuration – Processing – Extra Wash Cycles.
- b) In the next empty space, tick Active and select All (tests) carries over to KAP and select the "CLEAN" cassette as cleaner.
- c) In the comments, enter ALL/KAP/CLEAN

On the Integra 400/400plus

Carry out "beginning of day (BOD)" probe deproteinisation and "prime fluid system" actions.

- 8.4.2 In order to run **Freelite** tests, the reagents must be placed in the supplied Roche C-pack cassette (as shown above). Each C-pack has a unique barcode identified by the analyser, which allows only 100 tests to be aspirated. The cassette must then be discarded.

- 8.4.3 Users should only use exact volumes of standard and control materials as detailed below:

- Use 450µL of the Lambda Free Standard per calibration in a sample cup.
- Use 150µL of the Lambda Free Control per test in a sample cup.
- Use 150µL of the Lambda Free High Control per test in a sample cup.

Failure to aliquot sufficient calibrator volume into a sample cup will result in 12 tests being wasted.

Complete **Freelite** kit implementation instructions for the Integra 400/400plus/800 analysers are available. Please contact your local Binding Site distributor for further information.

### 8.5 Measuring range

**Integra 400 and 400plus:** All samples must be assayed first at the Initial 1/8 assay dilution, giving an approximate measuring range of 5.2-139mg/L. Alternative reassay dilutions, known as Factor A, Factor B and Factor D, are also available; with Factor D, the assay sensitivity is reduced to 1.3mg/L. The upper limit of the measuring range using Factor A is 1390mg/L; for higher concentration samples make a 1/10 manual pre-dilution. See below for summary:

Factor	Integra stated dilution	Actual overall dilution	Manual pre-dilution	Approximate range (mg/L)
D	4	1:2	-	1.3 – 34.7
Initial	1:1	1:8	-	5.2 – 139
B	1:10	1:80	-	52 – 1390
A	1:100	1:800	-	520 – 13900
A	1:100	1:8000	1/10*	5200 – 139000

\* Make a manual pre-dilution of 1/10 by taking 100µL of sample and add 900µL normal physiological saline (0.9%). Present the 1/10 diluted sample for analysis using Factor A. Multiply the result x 10.

**Integra 800:** All samples must be assayed at the Initial 1/8 sample dilution, giving an approximate measuring range of 5.2 – 139mg/L. Alternative reassay dilutions known as "Dilute" and "Concentrate" are available. With "Concentrate" the assay sensitivity is reduced to 1.3 mg/L. The upper limit of the measuring range using "Dilute" is 1390mg/L. For higher concentration samples make a 1/100 manual pre-dilution and present this for analysis at the default assay dilution.

Post-action	Integra stated dilution	Actual overall dilution	Manual pre-dilution	Approximate range (mg/L)
Concentrate	4	1:2	-	1.3 – 34.7
Initial	1:1	1:8	-	5.2 – 139
Dilute	1:10	1:80	-	52 – 1390
Manual dilution	1:1	1:800	1/100**	520 – 13900
Manual dilution (automatic repeat)	1:10	1:8000	1/100**	5200 – 139000

\*\*Make a manual 1/100 predilution by taking 100µL of sample and add 900µL normal physiological saline (0.9%) to achieve an initial 1/10 dilution. From this, take 100µL of this dilution and add 900µL of physiological saline (0.9%) to achieve a final 1/100 dilution. Present the 1/100 diluted sample for analysis. Multiply the result x 100.

### 8.6 Antigen Excess

All turbidimetric assays may be susceptible to antigen excess with high concentration samples, leading to falsely low results. With **Freelite**, the amino acid composition of the free light chain produced by an individual B cell clone will influence the level at which a sample may show antigen excess. The Integra monitors the initial reaction kinetics of each sample and compares the results to reaction limits set through testing of an extensive myeloma library. Samples detected as being in excess are flagged with "HIGH ACTIVITY" in the results and should be remeasured at a higher dilution to remove the antigen excess (see Section 8.5). On the Integra 400/400plus remeasure samples at the 1:10 non-standard dilution (Factor B) and then 1:100 non-standard dilution (Factor A) if required. On the Integra 800 remeasure samples using the Dilute reassay conditions and with a 1/100 manual predilution if required.

**Important Note:** A very small percentage of samples in antigen excess have normal reaction kinetics so will not prompt the "HIGH ACTIVITY" flag. It is recommended that the following statement accompany all free light chain results.

*"Undetected antigen excess is a rare event but cannot be excluded. If these free light chain results do not agree with other clinical or laboratory findings, or if the sample is from a patient that has previously demonstrated antigen excess, the result must be checked by retesting at a higher sample dilution."*

## 9 QUALITY CONTROL

The controls provided should be included in all assay runs. The lambda free concentration is stated on the accompanying Product Data sheet (SIN123.DS). Results obtained during the run should only be accepted if the control results obtained are within ±20% of the concentration(s) stated.

Should a control measurement be out of range when assayed with a stored curve the assay must be recalibrated. If on recalibration the control values measured with the new curve are still out of range, the instrument should be checked before repeating the assay. If problems persist, refer to supplier.

## 10 LIMITATIONS

- 10.1 Turbidimetric assays are not suitable for measurement of highly lipaemic or haemolysed samples or samples containing high levels of circulating immune complexes (CICs) due to the unpredictable degree of non-specific scatter these sample types may generate. Unexpected results should be confirmed using an alternative assay method. Possible interference due to the presence of rheumatoid factor can also occur (see Section 12.6)
- 10.2 Diagnosis cannot be made and treatment must not be given on the basis of free light chain measurements alone. Clinical history and other laboratory findings must be taken into account.
- 10.3 **Antigen excess:** see Section 8.6
- 10.4 Each monoclonal FLC contains unique amino acid combinations. It is therefore theoretically possible for certain monoclonal proteins to be undetectable by immunoassay leading to lower than expected measurements. In practice this

occurs extremely rarely with the **Freelite** assay. Samples suspected to be in antigen excess which is not detected by the instrument should be tested by repeating at a higher dilution to preclude antigen excess (see section 8.6). This should be followed by further investigation using other laboratory methods (immunofixation and serum protein electrophoresis).

- 10.5** The nature of monoclonal proteins can cause a non-linear response in immunoassays, potentially leading to inconsistent results; this can be avoided by always diluting the samples in the sequence 1:1, 1:10, 1:100 (Initial, Factor B, Factor A on the Integra 400/400plus or "Initial", "Dilute" on the Integra 800 – see Section 8.5). Omitting a dilution step or using alternative dilutions should be avoided.
- 10.6** Due to the highly variable nature of monoclonal proteins, different reagent batches may react slightly differently to the FLC epitopes in some patient samples. In these instances, sample results may vary when tested using multiple batches. Care should be taken when monitoring patients across multiple reagent lots. We recommend, wherever possible, that previous and current samples are tested on new reagent lots and the results compared.
- 10.7** Carry-over experiments have demonstrated that a number of other chemistries may interfere with Kappa Free results when run in a random access mode. Therefore, users must run all **Freelite** assays in batch mode as detailed in Section 8.4.1. Failure to do so may lead to elevation of the Kappa Free result and distortion of the Kappa/Lambda ratio. The carry-over investigations have demonstrated that **Freelite** assays do **not** interfere with other chemistries. Please contact your local Binding Site distributor for further information.

## 11 EXPECTED VALUES

The ranges provided have been obtained from a limited number of samples and are intended for guidance purposes only. Wherever possible it is strongly recommended that local ranges are generated.

### 11.1 Adult serum ranges

282 normal subjects aged from 20 to 90 years were assayed using Binding Site **Freelite** assays for the BN™II\*<sup>(1)</sup>. The results are shown in the table below.

Normal adult serum	Mean conc.	Median conc.	95 Percentile range
Free kappa	8.36 (mg/L)	7.30 (mg/L)	3.30 - 19.40 (mg/L)
Free lambda	13.43 (mg/L)	12.40 (mg/L)	5.71 - 26.30 (mg/L)
	Mean	Median	Total range
Kappa/Lambda ratio	0.63	0.60	0.26 - 1.65

In order to demonstrate equivalence of the normal range obtained with the BNII and Integra assays, 50 normal samples from UK donors aged from 20 to 60 years were assayed using both the BNII and Integra **Freelite** kits. Results are summarised under "Normal Sera" in Section 12.8.

\*BN™ is a trademark of Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.

## 12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A precision study was performed following NCCLS *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Approved Guideline* (NCCLS Document EP5-A). The study was carried out on an Integra 400 over 21 working days, with two runs per day. One user assessed three different samples using three different reagent lots on one analyser.

### 12.1 Within-run precision

	Lambda FLC		
	Mean (mg/L)	SD	CV %
Serum 1	7.72	0.17	2.3
Serum 2	27.0	0.18	0.7
Serum 3	99.2	0.72	0.7

### 12.2 Between-run precision

	Lambda FLC		
	Mean (mg/L)	SD	CV %
Serum 1	7.72	0.19	2.5
Serum 2	27.0	0.21	0.8
Serum 3	99.2	0.73	0.7

### 12.3 Between-day precision

	Lambda FLC		
	Mean (mg/L)	SD	CV %
Serum 1	7.72	0.29	3.7
Serum 2	27.0	0.42	1.5
Serum 3	99.2	1.60	1.6

### 12.4 Total precision

	Lambda FLC		
	Mean (mg/L)	SD	CV %
Serum 1	7.72	0.39	5.0
Serum 2	27.0	0.50	1.9
Serum 3	99.2	1.90	1.9

### 12.5 Linearity

The linearity of this assay was confirmed using a serially diluted polyclonal serum sample, which gave a regression plot of  $y = 1.004x - 1.123$  (mg/L),  $r = 1.00$  ( $y$  = measured free lambda concentration,  $x$  = theoretical concentration).

### 12.6 Interference

Minimal assay interference by 200mg/L bilirubin (-1.7%), 5.7g/L haemoglobin (3.8%) and 0.5% intralipid (-1.9%) was demonstrated using an 8.0mg/L free lambda control serum. Minimal interference (+3.3%) by 480 IU/mL rheumatoid factor has been demonstrated using an 18mg/L free lambda serum sample.

### 12.7 Analytical sensitivity

The analytical sensitivity of this assay (1.3mg/L) was confirmed by assaying ten replicates of two pooled human serum samples with concentrations equivalent to 140% and 200% of this value; the two sets of results did not overlap.

### 12.8 Comparison

50 normal adult sera and 82 clinical adult sera (from known/suspected multiple myeloma and systemic lupus erythematosus patients) were tested on the **Freelite** Integra and **Freelite** BNII assays. Results were as follows:

	Normal sera	Clinical sera
Range (mg/L)	3 – 19 mg/L	1.0 – 18700 mg/L
Passing Babcock regression	$y = 1.08x - 1.09$	$y = 0.9988x - 0.7282$
linear regression $R^2$	$R^2 = 0.9351$	$R^2 = 0.9673$

## 13 BIBLIOGRAPHY

- Cole PW, Durie BGM, Salmon SE (1978). Immunoquantitation of free light chain immunoglobulins: Application in multiple myeloma. *J. Immunol. Meth.* **19**: 341-349.
- Pescali E, Pezozoli A (1988). The clinical spectrum of pure Bence-Jones proteinuria. *Cancer* **61**: 2408-2415.
- Solling K, Solling J, Romer FK (1981). Free light chains of immunoglobulins in serum from patients with rheumatoid arthritis, sarcoidosis, chronic infections and pulmonary cancer. *Acta. Med. Scand.* **209**: 473-477.
- Drayson MT, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith HD and Bradwell AR (2001). Serum free light chain measurements for identifying and monitoring patients with non-secretory multiple myeloma. *Blood* **97**: 2900-2902.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT and Drew RL (2001). Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin. Chem.* **47**: 4, 673-680.
- Tang LX, Showell P, Carr-Smith HD, Mead GP, Drew R and Bradwell AR (2000). Evaluation of F(ab')<sub>2</sub>-based latex-enhanced nephelometric reagents for free immunoglobulin light chains on the Behring Nephelometer™ II. *Clin. Chem* **46**: 6, Suppl. 2000, 705, pA181.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC and Drayson MT (2003). Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* **361**: 489-491.
- Abraham RS, Katzman JA, Clark RJ, Bradwell AR, Kyle RA and Gertz MA (2003). Quantitative Analysis of Serum Free Light Chains: A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. *Am. J. Clin. Pathol.* **119**: (2): 274-278.
- Lachmann HJ, Gallimore JR, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB and Hawkins PN (2003). Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating immunoglobulin free light chains following chemotherapy. *Brit. J. Haem.* **122**: 78-84.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP and Drayson MT (2002). Serum free light chain immunoassays and their clinical application. *Clinical and Applied Immunology Reviews* **3**: 17 – 33.
- Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell, AR and Kyle RA (2002). Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin. Chem.* **48**: 1437-1444.
- Bradwell AR (2009). *Serum Free Light Chain Analysis*, 5<sup>th</sup> Edition. Publ. The Binding Site Ltd, Birmingham, UK.
- Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, Morgan GJ, Child JA and Bradwell AR (2004). Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *Brit. J. Haematol.* **126**, 348-354.

1	Verwendungszweck
2	Einführung
3	Prinzip
4	Reagenzien
5	Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen
6	Lagerung und Stabilität
7	Probenentnahme und –vorbereitung
8	Testdurchführung
9	Qualitätskontrolle
10	Grenzen des Tests
11	Erwartete Werte
12	Leistungsdaten
13	Referenzen

## Freelite® Human Lambda Freie Leichtketten Kit zur Verwendung auf dem Roche Cobas Integra®

### Zur *in-vitro* Diagnostik

Bestell-Nr.: LK018.RI

In England hergestellt von:

The Binding Site Group Ltd., 8 Calthorpe Road, Edgbaston, Birmingham B15 1QT, UK  
www.bindingsite.co.uk

Vertrieb in Deutschland und Österreich durch:

The Binding Site GmbH, Robert-Bosch-Straße 2A,  
D-68723 Schwetzingen, Deutschland  
Telefon: +49 (0) 6202 92 62 0  
Fax: +49 (0) 6202 92 62 222  
e-mail: office@bindingsite.de

**Freelite®** ist in Europa und USA ein eingetragenes Warenzeichen von The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK.  
Cobas Integra® ist eine eingetragenes Warenzeichen von Roche Diagnostics GmbH, Deutschland.



#### 1 VERWENDUNGSZWECK

Dieser Kit dient zur quantitativen Bestimmung der Freien Leichtkette „Lambda“ im Serum unter Verwendung des Roche Cobas Integra 400 / 400plus und 800. Die quantitative Bestimmung der Freien Leichtketten unterstützt die Diagnose und die Verlaufskontrolle bei Multiplem Myelom, lymphozytären Tumoren, Morbus Waldenström, AL-Amyloidose, Light Chain Deposition Disease und Bindegeweberkrankungen wie z.B. Systemischer Lupus erythematoses (SLE) zusammen mit anderen Befunden aus Labor und Klinik.

#### 2 EINFÜHRUNG

Immunglobulin-Moleküle setzen sich aus zwei identischen schweren Ketten ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  oder  $\mu$ ), die durch die Immunglobulinklasse definiert wird und zwei identischen Leichtketten ( $\kappa$  oder  $\lambda$ ) zusammen. Jede Leichtkette ist kovalent an eine schwere Kette gebunden. Die zwei schweren Ketten sind in der Gelenks-Region ebenfalls miteinander kovalent verknüpft. Im Serum von gesunden Individuen kommt die Mehrheit der Leichtketten in dieser Form, also an die schwere Kette gebunden, vor. Allerdings werden auch geringe Mengen an Freien Leichtketten (FLC) im Serum von Gesunden gefunden, da die Plasmazellen sie im Überschuss produzieren und sekretieren. Das Molekulargewicht der Leichtketten ( $\kappa$  und  $\lambda$ ) beträgt ca. 22,5kD. Im Serum kommt die Freie Kappa-Leichtkette ( $\kappa$ -FLC) überwiegend als Monomer, die Freie Lambda-Leichtkette ( $\lambda$ -FLC) als kovalent-gebundenes Dimer, mit einem Molekulargewicht von ca. 45kD, vor. Dies führt zu einer unterschiedlichen Filtrationsrate für  $\kappa$ -FLC und  $\lambda$ -FLC, was eine mögliche Erklärung des im Serum gefundenen  $\kappa$ -FLC /  $\lambda$ -FLC Verhältnis von 0,625 ist. Das  $\kappa$  /  $\lambda$ -Verhältnis der gebundenen Leichtketten ist dagegen 2,0.

Erhöhte Serumkonzentrationen an monoklonalen Freien Leichtketten sind mit der malignen Proliferation von Plasmazellen (z.B. Multiples Myelom), AL Amyloidose und der Ablagerung von Freien Leichtketten (free light chain deposition disease) assoziiert. Erhöhte Serumkonzentrationen an polyklonalen Freien Leichtketten können bei Autoimmun-erkrankungen wie SLE auftreten<sup>(1-11)</sup>.

#### 3 PRINZIP

Zur Bestimmung eines löslichen Antigens mittels Turbidimetrie wird die zu testende Probe in eine Küvette, die den entsprechenden Antikörper enthält, zugegeben. Beim Fortschreiten der Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der unlösliche Immunkomplexe gebildet werden, wird das in die Küvette eingestrahlte Licht zunehmend gestreut. Die Lichtstreuung wird bestimmt, indem die Intensitätsabnahme des einfallenden Lichtstrahls gemessen wird. Da der Antikörper im Überschuss vorliegt, ist die Immunkomplexbildung proportional zur Antigenkonzentration. Durch Messung einer Reihe von Standards mit bekannter Antigenkonzentration wird eine Kalibrationskurve erstellt. Die Antigenkonzentration von unbekannten Proben wird nach Messung direkt anhand der Kalibrationskurve ermittelt.

Die Empfindlichkeit der turbidimetrischen Tests kann durch eine Partikelverstärkung erhöht werden<sup>(6)</sup>. Dazu wird der Antikörper an einen Partikel geeigneter Größe gekoppelt, dadurch wird das relative Streulichtsignal während der Antigen-Antikörper-Reaktion verstärkt.

#### 4 REAGENZIEN

**4.1 Latex-Reagenz:** Besteht aus einem monospezifischen Antikörper, der an Polystyren-Latexpartikel gekoppelt wurde. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,05% ProClin™\*, 0,1% E-aminocapronsäure (EACA) und 0,01% Benzamidin.

**4.2 Kalibrator und Kontrollen:** Sie werden aus normalem Humanserum hergestellt und enthalten polyklonales Freies Lambda und liegen als stabilisierte Flüssigkeiten vor. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid, 0,1% EACA und 0,01% Benzamidin.

**4.3 Zusatzreagenz:** Enthaltene Konservierungsmittel: 0,099% Natriumazid.

\*ProClin™ ist ein Warenzeichen von Rohm and Haas Corp., Philadelphia, PA.

#### 5 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Jede Einzelspende von humanem Serum wurde untersucht und bezüglich Antikörper gegen das Human-Immunschwäche-Virus (HIV 1 & 2), das Hepatitis-C-Virus und gegen das Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAG) als negativ befunden. Die hierfür verwendeten Tests sind entweder von der FDA (USA) zugelassen oder für den Gebrauch in der *in vitro* Diagnostik in der EU freigegeben (Directive 98/79/EC, Annex II). Es gibt aber zur Zeit keine absolut sicheren Testmethoden zum Ausschluss dieser und anderer Infektionsträger. **Umgangs- und Entsorgungsmethoden sollten denen für potentiell infektiösem Material entsprechen (inklusive dem Tragen entsprechender Schutzkleidung).** Der Test sollte nur von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.

Dieses Produkt enthält Natriumazid und ProClin 300 und muss mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen behandelt werden. Verschlucken sowie Kontakt mit Haut (v.a. bei Verletzungen) oder Schleimhäuten vermeiden. Nach Kontakt Hautstelle mit viel Wasser abspülen und ärztlichen Rat einholen. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohren explosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung mit ausreichender Menge Wasser, nachspülen um Azidablagerungen zu vermeiden.

Dieser Test sollte nur für den angegebenen Verwendungszweck von entsprechend geschultem Laborpersonal durchgeführt werden. Die Einhaltung der Arbeitsanleitung bei allen Arbeitsschritten ist dringend notwendig. Bei Verwendung von abgeänderten Testparametern kann die Richtigkeit der Ergebnisse nicht garantiert werden.

Reagenzien unterschiedlicher Chargen dürfen **NICHT** untereinander gemischt oder gemeinsam verwendet werden. Bei großem Testdurchsatz muss darauf geachtet werden, dass alle Reagenzien der gleichen Charge entstammen.

## 6 LAGERUNG UND STABILITÄT

Der ungeöffnete Kit ist bei 2-8°C bis zum auf der Packung angegebenen Verfallsdatum haltbar. **NICHT EINFRIEREN!** Das Latex- und das Zusatzreagenz können nach dem Öffnen bis zu 3 Monate in der C-Kassette im Gerät aufbewahrt werden. Der Kalibrator und die Kontrollen sind bei Lagerung bei 2-8°C bis zu 3 Monate nach dem Öffnen stabil, vorausgesetzt, die Reagenzien werden so gelagert, dass keine Verdunstung oder Verunreinigung stattfinden kann.

## 7 PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Immer frisches oder tiefgefrorenes Serum verwenden. Blutproben über Venenpunktur sammeln und auf natürliche Weise gerinnen lassen. Serum so schnell wie möglich vom Gerinnsel trennen um eine Hämolyse zu vermeiden. Die Seren können bei 2-8°C bis zu 21 Tage vor dem Test gelagert werden. Für eine längere Lagerung wird empfohlen die Proben unverdünnt bei mindestens -20°C einzufrieren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden. Keine mikrobiell oder mit Partikeln verunreinigte Proben oder hämolytische oder lipämische Seren verwenden.

## 8 TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweis: Um eine vollständige Interpretation der Ergebnisse durchführen zu können, sollte das Verhältnis „Freies Kappa/Freies Lambda“ berechnet werden. Deshalb sollten die Proben ebenfalls mit dem **Freelite** Kappa Freie Leichtketten Kit (Bestell-Nr.: LK016.RI) von Binding Site gemessen werden.

### 8.1 Gelieferte Materialien

- 8.1.1 1 x 100 Tests *Human Lambda Free Reagent (R2)* – (Latexreagenz)
- 8.1.2 1 x 100 Tests *Lambda Free Supplementary Reagent (R1)* – (Zusatzreagenz)
- 8.1.3 2 x 2mL *Human Lambda Free Standard* (Freies Lambda Kalibrator)
- 8.1.4 2 x 1.5mL *Human Lambda Free Control* (Freies Lambda Kontrolle)
- 8.1.5 2 x 1,5mL *Human Lambda Free High Control* (Freies Lambda Kontrolle, High Level)
- 8.1.6 1 x Roche blauer Öffner für Plastikflaschen
- 8.1.7 1 x Roche Barcodierte C-Kassette

### 8.2 Transfer der R1- und R2-Reagenzien in die C-Kassette (siehe Abb. 1).

- 8.2.1 Das Lambda-Latexreagenz (R2) in die Kammer B (rechte Seite der Kassette wenn der Barcode zum Betrachter zeigt) einfüllen und den Deckel sorgfältig verschließen (Roche blauen Öffner verwenden).
- 8.2.2 Das Lambda-Zusatzreagenz (R1) in Kammer A der Kassette (in der Mitte) einfüllen und den Deckel sorgfältig verschließen (Roche blauen Öffner verwenden). Kammer C nicht befüllen und nicht mit einem Deckel verschließen.

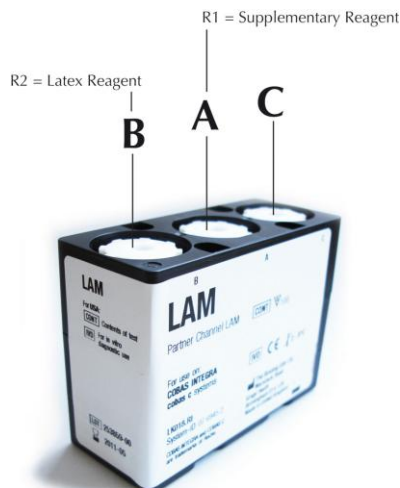


Abbildung 1: Transfer der Reagenzien in die C-Kassette.

Hinweis: Nur für Integra 800. Sobald die C-Kassette auf dem Gerät platziert wurde, muss sie dort verbleiben bis alle 100 Tests aufgebraucht sind. Ein vorzeitiges Entfernen der Kassetten vom Gerät führt zum Verlust des verbleibenden Reagenzes.

### 8.3 Benötigte, nicht im Kit enthaltene Materialien

- 8.3.1 Laborausstattung zum Sammeln und Vorbereiten der Proben (Probenröhrchen, z.B. 650µL Cobas Cup, Zentrifuge usw.).
- 8.3.2 Einen vollausgestatteten und funktionsfähigen Integra 400/400plus/800 mit einem ISE Rack, das mit 9% NaCl Diluents (Roche Produkt-Nr.: 20756350) beladen ist.
- 8.3.3 Nur für Integra 800: Cobas Integra Reinigungskassette (CLEAN), Cat. No. 20764337, System ID 07 6433 7.

### 8.4 Testdurchführung

Der Anwender sollte mit dem Integra 400/400plus/800 vertraut sein, bevor der Test durchgeführt wird. Sicherstellen, dass das aktuellste Update der TASU (Test Application SW) installiert ist.

- 8.4.1 Um eine Verschleppung anderer Reagenzien zu vermeiden, müssen die **Freelite** Tests batchweise und unabhängig von anderen Tests abgearbeitet werden. Zur Entfernung jeglicher störender Substanzen muss der Abarbeitung der **Freelite** Tests ein Waschschritt zur Reinigung der Nadel vorgeschaltet werden.

Am Integra 800: stellen Sie bitte sicher, dass die folgenden Einstellungen für den **Freelite-Kappa-Test** verwendet werden:

- a) Klicken Sie auf Konfiguration – Ablauf – Waschzyklen hinzufügen.
- b) Waschzyklus durch anklicken in dem leeren Feld auf Aktiv setzen und eine Verschleppung von „Alle“ (Tests) auf KAP auswählen. Als Reinigungslösung die „CLEAN“-Kassette auswählen.
- c) Als Bemerkung können Sie ALLE/KAP/CLEAN eingeben.

### Am Integra 400/400plus

Aus den „Arbeiten zu Tagesbeginn“ (AzT) „Protein von Nadeln entfernen“ und „Flüssigkeitssystem spülen“ durchführen.

- 8.4.2 Um die **Freelite** Tests durchzuführen, die Reagenzien in die beigelegte barcodierte Roche C-Kassette (s. Abb.) überführen. Jede C-Kassette hat einen eigenen Barcode, der vom Gerät erkannt wird und eine Abarbeitung von ausschließlich 100 Testen erlaubt. Die C-Kassette muss nach dem Gebrauch entsorgt werden.

- 8.4.3 Es sollten nur die folgenden exakten Volumina für die Standards und Kontrollen verwendet werden:

- 450µL Freies Lambda Standard pro Kalibration in einem Probengefäß.
- 150µL Freies Lambda Kontrolle pro Test in einem Probengefäß.
- 150µL Freies Lambda Kontrolle „high“ pro Test in einem Probengefäß.

Die Verwendung eines zu geringen Kalibratorvolumens in einem Probengefäß führt dazu, dass 12 Tests umsonst verbraucht werden.

Vollständige **Freelite** Kit Anwenderinstruktionen für die Integra 400/400plus/800 Geräte sind verfügbar. Für weitere Informationen kontaktieren Sie Ihre lokale Binding Site Geschäftsstelle.

### 8.5 Messbereich

**Integra 400 und 400plus:** Alle Proben müssen zuerst in der Standardprobenverdünnung von 1/8 gemessen werden, mit einem Messbereich von 5,2-139mg/L. Alternativ sind ebenfalls die Verdünnungen, genannt Faktor A, Faktor B und Faktor D, verfügbar. Daraus ergibt sich bei Verwendung von Faktor D eine Sensitivität von 1,3mg/L. Die obere Grenze des Messbereichs liegt bei Verwendung von Faktor A bei 13900mg/L. Proben, deren Konzentration oberhalb dieser Konzentration (Faktor A) liegt, sollten erneut mit einer manuell erstellten 1/10 Verdünnung gemessen werden. Zusammenfassung siehe nachstehende Tabelle:

Faktor	Integra Verdünnung	Aktuelle Gesamtverdünnung	Manuelle Vorverdünnung	Ungefährer Messbereich (mg/L)
D	4	1:2	-	1,3 – 34,7
Initial	1:1	1:8	-	5,2 – 139
B	1:10	1:80	-	52 – 1390
A	1:100	1:800	-	520 – 13900
A	1:100	1:8000	1/10*	5200 - 139000

\*Eine manuelle Vorverdünnung von 1/10 herstellen: 100µL Probe + 900µL physiologische Kochsalzlösung (0,9%). Diese 1/10-vorverdünnte Probe unter Verwendung von Faktor A messen. Das Messergebnis mit dem Faktor 10 multiplizieren.

**Integra 800:** Alle Proben müssen zuerst in der Standardprobenverdünnung von 1/8 gemessen werden, mit einem Messbereich von 5,2-139mg/L. Am Integra 800 gibt es Wiederholungsverdünnungen, die unter „Verdünnen“ oder „Konzentrieren“ angewählt werden können. Wählt man „Konzentrieren“ verringert sich die Sensitivität des Tests auf 1,3mg/mL. Bei Verwendung von „Verdünnen“ liegt die obere Grenze des Messbereichs bei 1390mg/mL. Höher konzentrierte Proben 1/100 manuell vorverdünnen und in der Geräte-Standardverdünnung messen.

Aktion	Integra Verdünnung	Aktuelle Gesamtverdünnung	Manuelle Vorverdünnung	Ungefährer Messbereich (mg/L)
Konzentrieren	4	1:2	-	1,3 – 34,7
Initial	1:1	1:8	-	5,2 – 139
Verdünnen	1:10	1:80	-	52 - 1390
Manuelle Verdünnung	1:1	1:800	1/100**	520 - 13900
Manuelle Verdünnung (automatische Nachmessung)	1:10	1:8000	1/100**	5200 - 139000

\*\*Eine manuelle 1/100-Verdünnung wie folgt herstellen: 100µL Probe + 900µL physiologische Kochsalzlösung (0,9%) ergibt eine 1/10-Verdünnung. Hiervon in einem zweiten Verdünnungsschritt 100µL mit 900µL physiologische Kochsalzlösung (0,9%) versetzen, um eine 1/100-Verdünnung zu erhalten. Diese verdünnte Probe mit den Standard-Testparametern messen. Das Ergebnis mit dem Faktor 100 multiplizieren.

### 8.6 Antigenüberschuss

Alle turbidimetrischen Tests können bei hochkonzentrierten Proben empfindlich gegen Antigenüberschuss sein, was zu falsch niedrigen Ergebnissen führt. Beim **Freelite**-Test beeinflusst die Zusammensetzung der Aminosäuren der Freien Leichtkette, welche von einem individuellen B-Zell-Klon produziert wird, jenes Level, bei dem die Probe in einen Antigenüberschuss gelangt. Der Integra bestimmt die initiale Reaktionskinetik jeder Probe und vergleicht dieses Ergebnis mit Reaktionsgrenzen, die durch Testung einer umfangreichen Myelom-Proben-Sammlung ermittelt wurden. Proben, bei denen ein Antigenüberschuss festgestellt wird, werden mit „HIGH ACTIVITY“ bei der Ergebnisausgabe markiert und sollten in einer höheren Verdünnung nachgemessen werden, um die Antigenüberschuss-Situation aufzuheben (siehe Abschnitt 8.5). Auf dem Integra 400/400plus sollten Proben in der 1:10 Nicht-Standardverdünnung (Faktor B) und, wenn notwendig anschließend in der 1:100 Nicht-Standardverdünnung (Faktor A) nachgemessen werden. Auf dem Integra 800 sollten Proben mit der „Verdünnen“-Option, und wenn notwendig mit einer manuellen 1:100 Vorverdünnung gemessen werden.

**Wichtiger Hinweis:** Ein sehr geringer Prozentsatz von Proben, die Antigenüberschuss aufweisen, haben eine normale Reaktionskinetik und werden demnach nicht mit einem „HIGH ACTIVITY“ markiert. Daher wird empfohlen, dass alle Freie-Leichtketten-Messwerte mit einem Kommentar mit folgendem Inhalt versehen werden:

„Ein unentdeckter Antigenüberschuss ist ein seltenes Ereignis, kann aber nicht ausgeschlossen werden. Wenn diese Freien-Leichtketten-Ergebnisse nicht mit den anderen klinischen oder Laborergebnissen übereinstimmen, oder wenn die Probe von einem Patienten stammt, der zuvor einen Antigenüberschuss gezeigt hat, muss das Ergebnis durch eine Wiederholungsmessung in einer höheren Probenverdünnung überprüft werden.“

## 9 QUALITÄTSKONTROLLE

Die im Kit enthaltenen Kontrollen sollten in jedem Testansatz mitgeführt werden. Die Lambda Freie Leichtketten Konzentration ist auf dem im Kit mitgelieferten Kalibrator/Kontrolldatenblatt (Product Data Sheet, SIN123.DS) angegeben. Ergebnisse sollten nur akzeptiert werden, wenn die Kontrollen nicht mehr als  $\pm 20\%$  von den angegebenen Konzentrationen abweichen. Liegt eine Kontrolle außerhalb des Vertrauensbereichs und wurde eine gespeicherte Kalibrationskurve verwendet, so wird empfohlen den Test neu zu kalibrieren. Liegt die Kontrolle auch nach der neuen Kalibration außerhalb des Vertrauensbereichs, sollte das Gerät überprüft werden. Lässt sich das Problem nicht lösen, wenden Sie sich bitte an Ihre Lieferfirma.

## 10 GRENZEN DES TESTS

- 10.1** Turbidimetrische Tests sind nicht für die Bestimmung von stark lipämischen oder hämolytierten Proben, oder Proben, die zirkulierende Immunkomplexe enthalten, geeignet, da diese Proben einen nicht vorhersagbaren Anteil an unspezifischen Streulicht erzeugen können. Ungewöhnliche Ergebnisse sollten mit einer alternativen Methode überprüft werden. Mögliche Interferenzen können in der Anwesenheit vom Rheumafaktor auftreten (siehe Abschnitt 12.6)
- 10.2** Die Diagnose und die Einleitung einer Therapie dürfen nicht ausschließlich auf der Bestimmung der Freien Leichtketten alleine basieren. Das klinische Bild und andere Laborbefunde müssen ebenfalls berücksichtigt werden.
- 10.3** **Antigenüberschuss:** siehe Abschnitt 8.6.
- 10.4** Jede monoklonale Freie Leichtkette enthält einzigartige Aminosäuresequenzen. Daher ist es möglich, dass bestimmte monoklonale Freie Leichtketten durch den Immunoassay nicht erfasst werden, was sich in niedrigeren Messwerten als erwartet äußert. In der Praxis findet man dieses Phänomen bei Verwendung der **Freelite** Kits extrem selten. Proben, bei denen ein Antigenüberschuss vermutet wird, der nicht von dem Gerät erkannt wurde, sollten erneut in einer höheren Verdünnung gemessen werden, um einen Antigenüberschuss ausschließen zu können (siehe Abschnitt 8.6). Solche Proben sollten durch weitere Labormethoden (Immundefixation und Serumproteinelektrophorese) zusätzlich untersucht werden.
- 10.5** Der Charakter monoklonaler Proteine kann in Immunoassays zu einem nicht-linearen Verhalten führen, was möglicherweise in widersprüchlichen Ergebnissen resultiert. Dies kann verhindert werden, indem die Proben immer in der Reihenfolge 1:1, 1:10, 1:100 (Initial, Faktor B, Faktor A auf dem Integra 400/400plus oder „Initial“, „Verdünnen“ auf dem Integra 800) verdünnt werden (siehe Abschnitt 8.5). Es sollte vermieden werden eine Verdünnung auszulassen oder alternative Verdünnungen zu verwenden.
- 10.6** Aufgrund der hohen Variabilität der monoklonalen Proteine, können verschiedene Reagenzienchargen bei einigen Patientenproben möglicherweise mit den Epitopen einiger Freier Leichtketten unterschiedlich reagieren. In diesen Fällen können die Messergebnisse variieren, wenn die Probe mit verschiedenen Reagenzienchargen gemessen wird. Falls bei der Verlaufskontrolle verschiedene Reagenzienchargen verwendet werden, wird empfohlen, wenn möglich die vorhergehende Probe zeitgleich mit der aktuellen Probe zu messen und die entsprechenden Messergebnisse miteinander zu vergleichen.
- 10.7** Carry-over-Experimente haben gezeigt, dass eine Reihe anderer Tests die Ergebnisse des Freien Kappa-Tests unter Umständen beeinflussen können, wenn die Proben mittels „random access“ gemessen werden. Deshalb müssen die **Freelite**-Tests batchweise gemessen werden (Details siehe Abschnitt 8.4.1). Das Nichtbeachten dieser Vorgehensweise kann zu erhöhten Freien-Kappa-Ergebnissen und zu einer Verzerrung der Kappa/Lambda-Ratio führen. In den Carry-over-Experimenten wurde gezeigt, dass **keine** Verschleppung von den **Freelite**-Assays auf andere Tests stattfindet. Für weitere Informationen, wenden Sie sich bitte an Ihre Lieferfirma.

## 11 ERWARTETE WERTE

Die aufgeführten Normalbereiche basieren auf der Untersuchung eines normalen Spenderkollektivs und dienen nur zur Orientierung. Es wird dringend empfohlen wenn möglich lokale Normbereiche zu bestimmen.

### 11.1 Erwachsene – Normalbereiche im Serum

282 Seren von gesunden Erwachsenen im Alter zwischen 20 und 90 Jahren wurden unter Verwendung der Binding Site **Freelite** Kits für den BN™II<sup>11</sup> untersucht<sup>(11)</sup>. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt:

Normale Erwachsene Serum	Mittlere Konz.	Median Konz.	Bereich 95 Perzentile
Freies Kappa	8,36 (mg/L)	7,30 (mg/L)	3,30 – 19,40 (mg/L)
Freies Lambda	13,43 (mg/L)	12,40 (mg/L)	5,71 – 26,30 (mg/L)
	<b>Mittelwert</b>	<b>Median</b>	<b>Gesamtbereich</b>
Kappa/Lambda-Ratio	0,63	0,60	0,26 – 1,65

In einer Vergleichsstudie zwischen den **Freelite** BNII und Integra Kits wurde gezeigt, dass die Normalbereiche der beiden Methoden vergleichbar sind. Dazu wurden 50 Seren von normalen britischen Blutspendern im Alter zwischen 20 und 60 Jahren auf beiden Analysengeräten parallel bestimmt. Die Ergebnisse sind im Abschnitt 12.8 unter „Normalseren“ zusammengefasst.

<sup>11</sup>BN™ ist ein Warenzeichen Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.

## 12 LEISTUNGSDATEN

Eine Präzisionsstudie wurde gemäß der Richtlinie 'NCCLS Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Approved Guideline (NCCLS Document EP5-A)' auf dem Integra 400 durchgeführt. Während dieser Studie wurde an 21 Arbeitstagen je 2 Testansätze pro Tag durchgeführt. Es wurden 3 verschiedene Proben mit drei verschiedenen Reagenzienchargen an einem Gerät gemessen.

### 12.1 Intra-Assay-Variation

	Lambda FLC		
	Mittelwert (mg/L)	SA	VK%
Serum 1	7,72	0,17	2,3
Serum 2	27,0	0,18	0,7
Serum 3	99,2	0,72	0,7

### 12.2 Inter-Assay-Variation

	Lambda FLC		
	Mittelwert (mg/L)	SA	VK %
Serum 1	7,72	0,19	2,5
Serum 2	27,0	0,21	0,8
Serum 3	99,2	0,73	0,7

## 12.3 Tag zu Tag Präzision

	Lambda FLC		
	Mittelwert (mg/L)	SA	VK %
Serum 1	7,72	0,29	3,7
Serum 2	27,0	0,42	1,5
Serum 3	99,2	1,60	1,6

## 12.4 Gesamtpräzision

	Lambda FLC		
	Mittelwert (mg/L)	SA	VK %
Serum 1	7,72	0,39	5,0
Serum 2	27,0	0,50	1,9
Serum 3	99,2	1,90	1,9

## 12.5 Linearität

Die Linearität des Tests wurde durch Messen einer seriellen Verdünnungsreihe eines Serums mit polyklonalen Freien Leichtketten bestätigt: Regressionsanalyse:  $y = 1,004x - 1,123$  (mg/L),  $r = 1,00$  ( $y$  = gemessene Konzentration an Freiem Lambda,  $x$  = theoretische Konzentration).

## 12.6 Interferierende Substanzen

Geringfügige Interferenzen wurden bei 200mg/L Bilirubin (-1,7%), 5,7g/L Hämoglobin (+3,8%) und 0,5% Intralipid (-1,9%) bei der Messung einer ‚Freies Lambda-Kontrolle‘ (8,0mg/L) gefunden. Geringfügige Interferenzen (+3,3%) mit 480 IU/mL Rheumafaktor ist bei der Messung einer ‚Freien Lambda Probe‘ (18mg/L) gefunden worden.

## 12.7 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität dieses Tests (1,3mg/L) wurde durch 10-fache Messung von 2 humanen Proben, deren FLC-Konzentration 140% bzw. 200% dieser Konzentration entspricht, bestätigt. Es wurden 2 unterschiedliche Datensätze erhalten, die sich nicht überschneiden.

## 12.8 Vergleichsuntersuchungen

50 Seren von gesunden Erwachsenen und 82 Patientenseren (mit bekanntem /vermutetem Multiplem Myelom oder Systemischem Lupus erythematodes) wurden mit den **Freelite** Integra und **Freelite** BNII Kits gemessen. Ergebnisse wie folgt:

	Normale Seren	Klinische Seren
Bereich (mg/L)	3-19mg/L	1,0-18700mg/L
Passing-Bablok-Gleichung	$y=1,08x - 1,09$	$y=0,9988x - 0,7282$
Lineare Regression $R^2$	$R^2=0,9351$	$R^2=0,9673$

## 13 REFERENZEN

- Cole PW, Durie BGM, Salmon SE (1978). Immunoquantitation of free light chain immunoglobulins: Application in multiple myeloma. J. Immunol. Meth. **19**: 341-349.
- Pescali E, Pezozoli A (1988). The clinical spectrum of pure Bence-Jones proteinuria. Cancer **61**: 2408-2415.
- Solling K, Solling J, Romer FK (1981). Free light chains of immunoglobulins in serum from patients with rheumatoid arthritis, sarcoidosis, chronic infections and pulmonary cancer. Acta. Med. Scand. **209**: 473-477.
- Drayson MT, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith HD and Bradwell AR (2001). Serum free light chain measurements for identifying and monitoring patients with non-secretory multiple myeloma. Blood **97**: 2900-2902.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT and Drew RL (2001). Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. Clin. Chem. **47**: 4, 673-680.
- Tang LX, Showell P, Carr-Smith HD, Mead GP, Drew R and Bradwell AR (2000). Evaluation of F(ab')<sub>2</sub>-based latex-enhanced nephelometric reagents for free immunoglobulin light chains on the Behring Nephelometer™ II. Clin. Chem **46**: 6, Suppl. 2000: 705, pA181.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC and Drayson MT (2003). Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. Lancet **361**: 489-491.
- Abraham RS, Katzman JA, Clark RJ, Bradwell AR, Kyle RA and Gertz MA (2003). Quantitative Analysis of Serum Free Light Chains: A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. Am. J. Clin. Pathol. **119**: (2): 274 – 278.
- Lachmann HJ, Gallimore JR, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB and Hawkins PN (2003). Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating immunoglobulin free light chains following chemotherapy. Brit. J. Haem. **122**: 78-84.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP and Drayson MT (2002). Serum free light chain immunoassays and their clinical application. Clinical and Applied Immunology Reviews **3**: 17 – 33.
- Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell, AR and Kyle RA (2002). Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. Clin. Chem. **48**: 1437-1444.
- Bradwell AR (2009). Serum Free Light Chain Analysis, 5<sup>th</sup> Edition. Publ. The Binding Site Ltd, Birmingham, UK.
- Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, Morgan GJ, Child JA and Bradwell AR (2004). Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. Brit. J. Haematol. **126**, 348-354.

1	Indications
2	Présentation Générale
3	Principe
4	Réactifs
5	Précautions
6	Stockage et stabilité
7	Prélevement et préparation des échantillons
8	Méthodologie
9	Control de qualite
10	Limites
11	Valeurs attendues
12	Performances
13	Bibliographie

## Coffret Lambda Libres Humain Freelite® Pour utilisation sur Cobas Integra® de Roche

### Pour un usage en diagnostic *in-vitro*

Référence : LK018.RI

Produit fabriqué par :

The Binding Site Group Ltd., 8 Calthorpe Road, Edgbaston, Birmingham B15 1QT, UK  
www.bindingsite.co.uk

Distribué en France par la société :

The Binding Site France, 14 rue des Glairaux, BP226, 38522 Saint-Egrève Cedex.

Téléphone : 04.38.02.19.19

Fax : 04.38.02.19.20

e-mail : info@bindingsite.fr

En Europe et aux USA, **Freelite®** est une marque déposée de The Binding Site Group Ltd, Birmingham, RU.

Cobas Integra® est une marque déposée du groupe Roche, Allemagne.



#### 1 INDICATIONS

Ce coffret permet de quantifier les chaînes légères libres lambda dans le sérum sur les automates Cobas Integra 400 et 400plus et 800 de Roche. La mesure des taux de chaînes légères apporte une aide au diagnostic et au suivi des myélomes multiples, des néoplasmes lymphocytaires, des macroglobulinémies de Waldenström, des AL amyloses, des maladies de dépôt des chaînes légères et des maladies des tissus connectifs comme le lupus érythémateux disséminé, en corrélation avec d'autres résultats de laboratoire et clinique.

#### 2 PRESENTATION GENERALE

Les molécules d'immunoglobulines sont constituées de deux chaînes lourdes identiques ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ou  $\mu$ ) qui définissent la classe de l'immunoglobuline et de deux chaînes légères identiques ( $\kappa$  ou  $\lambda$ ). Chaque chaîne légère est attachée par des liaisons covalentes à l'une des chaînes lourdes, qui sont liées de façon covalente par la région charnière. Chez les patients sains, la majorité des chaînes légères dans le sérum sont liées aux chaînes lourdes. Cependant, les chaînes légères libres (ChLL) sont trouvées à de faibles taux dans le sérum des sujets normaux. Ceci est dû à une surproduction et sécrétion des ChLL par des plasmocytes. Bien que le poids moléculaire des deux chaînes légères soit d'environ 22,5kD, la chaîne libre  $\kappa$  ( $\kappa$ -ChLL) existe de façon prédominante sous forme monomérique et la chaîne libre  $\lambda$  ( $\lambda$ -ChLL) sous forme dimérique liée de façon covalente avec un poids moléculaire d'environ 45kD. Ceci induit un taux de filtration glomérulaire différentiel pour  $\kappa$ -ChLL et  $\lambda$ -ChLL et peut expliquer le rapport sérique  $\kappa$ -ChLL /  $\lambda$ -ChLL observé de 0,625 comparé au taux de chaînes légères liées  $\kappa$  /  $\lambda$  de 2,0.

Des taux sériques élevés de chaînes légères libres sont associés à une prolifération maligne de plasmocytes (ex. myélomes multiples), à l'amylose AL et à la maladie de dépôt des chaînes légères. Des taux sériques élevés de chaînes légères polyclonales peuvent être associés à des maladies autoimmunes telles que le lupus érythémateux disséminé<sup>(1-11)</sup>.

#### 3 PRINCIPE

L'évaluation de la concentration d'un antigène soluble par turbidimétrie nécessite l'ajout de l'échantillon à une solution d'anticorps approprié dans une cuvette. Un faisceau de lumière traverse la cuvette et comme la réaction antigène-anticorps se produit, la diffusion de la lumière augmente au cours de la formation des complexes immuns insolubles. La lumière diffusée est contrôlée par la mesure de l'atténuation d'un faisceau rayonnant incident. L'anticorps dans la cuvette est en excès pour que la quantité de complexes immuns formés soit proportionnelle à la concentration d'antigène. Une série de calibrateurs dont la concentration en antigène est connue est utilisée pour construire une courbe de calibration avec la lumière diffusée versus la concentration en antigène. Les échantillons de concentration inconnue sont testés et leur résultat est déterminé à partir de la courbe de calibration.

La sensibilité des tests en turbidimétrie peut être augmentée par l'utilisation de particules de latex<sup>(6)</sup>. Lorsque l'anticorps est accroché à des particules de taille convenable, il y a augmentation du signal relatif de la lumière diffusée de la réaction antigène-anticorps.

#### 4 REACTIFS

**4.1 Réactif latex :** Anticorps monospécifiques immobilisés sur du latex de polystyrène. Contient 0,05% ProClin™\*, 0,1% d'acide E-amino-n-caproïque (EACA), 0,01% benzamidine comme conservateurs.

**4.2 Calibrateurs et contrôles :** Sérums contenant des ChLL polyclonales lambda. Fournis sous forme liquide et contenant 0,099% d'azide de sodium, 0,1% EACA, 0,01% benzamidine comme conservateurs.

**4.3 Réactif supplémentaire :** Contient 0,099% d'azide de sodium comme conservateur.

\*ProClin™ est une marque déposée de Rohm and Haas Corp., Philadelphie, PA.

#### 5 PRECAUTIONS

Tous les sérums humains fournis dans ce coffret ont été testés et trouvés négatifs pour l'antigène de surface de l'hépatite B (Ag HBs), pour le virus de l'hépatite C et pour les anticorps anti-virus de l'immunodéficience humaine (HIV1 and HIV2). Les tests utilisés ont soit été approuvés par la FDA (USA) soit acceptés pour un usage en diagnostic *in-vitro* par l'union européenne (Directive 98/79/EC, Annexe II); néanmoins ces tests ne peuvent garantir l'absence d'agents infectieux. Tous les échantillons doivent donc être manipulés comme des produits potentiellement infectieux. Seul un personnel qualifié dans la manipulation d'échantillons potentiellement infectieux est autorisé à utiliser ce coffret.

Ce produit contient de l'azide de sodium et ProClin 300 et doit être manipulé avec précaution; des gants appropriés et d'autres vêtements de protection doivent être portés lors de toutes manipulations. Ne pas ingérer ou avoir de contact avec la peau (spécialement sur les zones abîmées) ou des muqueuses. S'il y a contact, laver abondamment avec de l'eau et demander un avis médical. Des azides de métaux explosifs peuvent se former par contact prolongé entre de l'azide de sodium et les tuyauteries en plomb et cuivre; pour éliminer les réactifs, rincer avec un large volume d'eau pour prévenir tout dégât.



Ce produit ne doit être utilisé que par du personnel entraîné. Le suivi de ces instructions est essentiel. Les résultats seront considérés comme invalides si d'autres paramètres sont utilisés.

Les réactifs de différents lots **NE SONT PAS** interchangeables. Si un nombre important de tests est réalisé, des précautions doivent être prises pour s'assurer que les réactifs utilisés sont issus du même lot.

## 6 STOCKAGE ET STABILITE

Le coffret non ouvert doit être stocké à 2-8°C et ce jusqu'à la date de péremption figurant sur son étiquette. NE PAS CONGELER. Les réactifs latex et supplémentaire peuvent être stockés jusqu'à 3 mois après ouverture dans la cassette C-pack de l'automate. Les standards et contrôles peuvent être conservés jusqu'à 3 mois après ouverture à 2-8°C lorsque des précautions concernant l'évaporation et la contamination sont prises.

## 7 PRELEVEMENT ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Utiliser du sérum frais ou congelé. Les sérums doivent être prélevés par ponction veineuse en laissant le caillot se former puis en séparant le sérum dès que possible afin d'éviter l'hémolyse. Les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C jusqu'à 21 jours semaines avant les tests ou congelés à -20°C minimum pour une conservation plus longue. Les congélations/décongélations successives doivent être évitées. Les échantillons de sérums contaminés par des bactéries ou contenant des particules, des lipides ou de l'hémoglobine ne doivent pas être utilisés.

## 8 METHODOLOGIE

Note : pour une interprétation complète des résultats, le rapport kappa/lambda doit être déterminé, les échantillons doivent par conséquent aussi être testés en utilisant le coffret kappa libre **Freelite** Binding Site (LK016.RI).

### 8.1 Matériel fourni

- 8.1.1 1 x 100 tests *Human Lambda Free Reagent (R2)* (Réactif lambda libres humaines, R2)
- 8.1.2 1 x 100 tests *Lambda Free Supplementary Reagent (R1)* (Réactif supplémentaire lambda libre, R1)
- 8.1.3 2 x 2mL *Human Lambda Free Standard* (Standard lambda libres humaines)
- 8.1.4 2 x 1,5mL *Human Lambda Free Control* (Contrôle lambda libres humaines)
- 8.1.5 2 x 1,5mL *Human Lambda Free High Control* (Contrôle haut lambda libres humaines)
- 8.1.6 1 x Outil d'ouverture bleu Roche
- 8.1.7 1 x Cassette C-pack avec code-barres Roche

### 8.2 Transfert de R1 et R2 dans le C-pack (voir Figure 1).

- 8.2.1 Transférer le réactif lambda libres (R2) en position B (côté droit de la cassette avec code-barres face à l'utilisateur) et fermer à l'aide d'un bouchon en utilisant l'outil bleu Roche.
- 8.2.2 Transférer le réactif supplémentaire lambda libres (R1) en position A (milieu de la cassette) et fermer à l'aide d'un bouchon en utilisant l'outil bleu Roche.
- 8.2.3 Laisser la position C vide et sans capuchon.

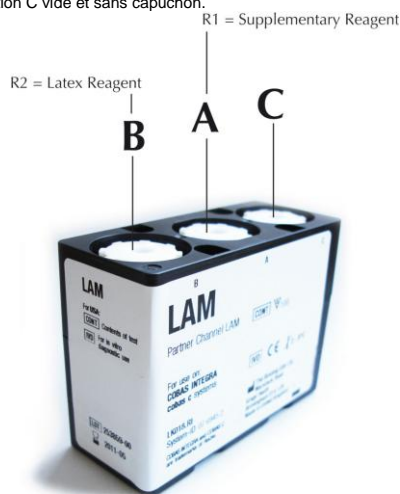


Figure 1: Transfert des réactifs dans la C-pack.

**NB:** Seulement pour les Integra 800. Une fois chargées sur l'automate, les C-packs doivent être maintenues à bord jusqu'à ce que les 100 tests aient été réalisés. Enlever les C-packs avant la réalisation de la totalité des tests résulte dans l'impossibilité de réaliser les tests restant avec ces C-packs.

### 8.3 Matériel nécessaire mais non fourni

- 8.3.1 Equipement nécessaire pour la collecte et la préparation des échantillons par ex. les tubes échantillons (par ex. les godets échantillons Cobas de 650µL), centrifugeuse, etc.
- 8.3.2 Un Integra 400/400plus/800 complet et opérationnel et un diluent avec du NaCl 9% (produit Roche référencé 207563350) chargé sur le portoir ISE.
- 8.3.3 **Integra 800 seulement:** Cassette de lavage Cobas Integra (CLEAN), Cat. No. 20764337, System ID 07 6433 7.

### 8.4 Procédure de test

L'utilisateur doit être formé pour l'utilisation de l'Integra 400/400plus/800 avant l'utilisation des procédures de test. S'assurer que la dernière version du TASU (Test Application SW Update - Mise à jour des applications de tests) ait été chargée.

- 8.4.1 Dans le but d'éviter toute contamination non spécifique par d'autres tests, les tests **Freelite** doivent être traités ensemble et indépendamment d'autres tests. Un lavage de l'aiguille doit être effectué avant chaque test en mode **BATCH** pour éliminer toutes les substances interférentes qui peuvent affecter les résultats **Freelite**.

Sur l'Integra 800, s'assurer que les paramètres suivants sont mis en place pour le test **Freelite Kappa**.

- a) Sélectionner Configuration - Processing - Extra Wash Cycles
- b) Dans l'espace vide suivant cocher sur Active et sélectionner Tous (All) les tests pour KAP et sélectionner la cassette « CLEAN » comme laveur.
- c) Dans les commentaires, entrer ALL/KAP/CLEAN

### Sur les Integra 400/400plus

Effectuer une déprotéinisation de l'aiguille en « beginning of day » (BOD) et les actions « prime fluid system ».

- 8.4.2 Dans le but de réaliser des tests **Freelite**, les réactifs doivent être placés dans la cassette C-pack Roche fournie (comme montré ci-dessus). Chaque C-pack a un code-barres unique identifié par l'analyseur qui permet uniquement à 100 tests d'être aspirés. La cassette doit être ensuite éliminée.

- 8.4.3 Les utilisateurs doivent utiliser des volumes de calibreurs et de contrôles strictement exacts comme indiqués ci-dessous :

- Utiliser 450µL de standard de lambda par calibration dans une cupule à échantillon
- Utiliser 150µL de Contrôle lambda libres humaines par test dans une cupule à échantillon
- Utiliser 150µL de Contrôle haut lambda libres humaines par test dans une cupule à échantillon

Une erreur de volume déposé de calibreur dans la cupule échantillon résultera en la perte de 12 tests.

Des instructions complètes pour l'installation des coffrets **Freelite** sur automates Integra 400/400plus/800 sont disponibles. Merci de contacter le distributeur local Binding Site pour plus de renseignements.

### 8.5 Gamme de mesure

**Integra 400 and 400plus :** Tous les échantillons doivent être mesurés en premier en utilisant la dilution échantillon standard 1/8 donnant une gamme approximative de 5,2-139mg/L. Des dilutions alternatives supplémentaires connues en tant que Facteur A, Facteur B et Facteur D sont aussi disponibles ; avec le Facteur D, la sensibilité du test est réduite à 1,3mg/L. La limite haute de la gamme de mesure est de 13900mg/L avec le Facteur A. Pour des échantillons de concentration supérieure, faire une pré-dilution manuelle au 1/10. Voir résumé ci-dessous :

Facteur	Dilution fixée sur l'Integra	Dilution globale actuelle	Pre-dilution manuelle	Gamme de mesure approximative (mg/L)
D	4	1:2	-	1,3 – 34,7
Initial	1:1	1:8	-	5,2 – 139
B	1:10	1:80	-	52 – 1390
A	1:100	1:800	-	520 – 13900
A	1:100	1:8000	1/10*	5200 – 139000

\*Faire une pré-dilution manuelle au 1/10 en prenant 100µL d'échantillon et en lui ajoutant 900µL de solution saline (0,9%). Présenter l'échantillon dilué au 1/10 pour analyse en utilisant le facteur A et multiplier le résultat par 10.

**Integra 800 :** Tous les échantillons doivent être mesurés en premier en utilisant la dilution échantillon standard 1/8 donnant une gamme approximative de 5,2-139mg/L. Sur l'Integra 800, des options de re-dilutions nommées « Dilute » ou « Concentrate » sont disponibles. Avec « Concentrate » la sensibilité du test est réduite à 1,3mg/L. La valeur haute de la gamme de mesure est 1270mg/L en utilisant « Dilute ». Pour les échantillons de concentration supérieure, faire une pré-dilution manuelle au 1/100 et charger l'échantillon pour un test à la dilution par défaut.

Post-action	Dilution Integra	Dilution totale	Pré-dilution manuelle	Gamme approximative(mg/L)
Concentré	4	1:2	-	1,3 – 34,7
Initial	1:1	1:8	-	5,2 – 139
Dilué	1:10	1:80	-	52 - 1390
Dilution manuelle	1:1	1:800	1/100**	520 - 13900
Dilution Manuelle (répétition automatique)	1:10	1:8000	1/100**	5200 - 139000

\*\*Faire une pré-dilution manuelle au 1/100 en mélangeant 100µL de l'échantillon et 900µL de solution saline (0,9%) pour obtenir une dilution initiale au 1/10. Prendre 100µL de cette dernière dilution et ajouter 900µL de solution saline (0,9%) pour obtenir une dilution finale au 1/100. Charger la dilution au 1/100 de l'échantillon pour test. Multiplier le résultat obtenu par 100.

### 8.6 Excès d'Antigène

Tous les tests turbidimétriques peuvent être confrontés à un excès d'antigène avec des échantillons de concentration élevée, conduisant à des résultats faussement bas. La composition en acides aminés de la chaîne légère produite par un clone individuel de cellules B influencera le niveau auquel un échantillon pourra présenter un excès d'antigène avec les tests **Freelite**. L'Integra surveille la cinétique de la réaction initiale de chaque échantillon et compare les résultats aux limites de réaction mesurées lors de tests d'une bibliothèque étendue d'échantillons de myélomes. Les échantillons détectés comme étant en excès sont identifiés par une marque « HIGH ACTIVITY » dans les résultats et doivent être réévalués à une dilution plus élevée pour éliminer tout risque d'excès d'antigène (voir section 8.5). Sur l'Integra 400/400plus, remesurer les échantillons à la dilution 1:10 non-standard (Facteur B) puis à la dilution 1:100 non-standard (facteur A) si nécessaire. Sur l'Integra 800, remesurer les échantillons en utilisant les paramètres du protocole de redilution et avec une prédilution au 1/100 manuelle si nécessaire.

**Note Importante:** Un très faible pourcentage d'échantillons en excès d'antigène ont une cinétique de réaction normale et ne seront donc pas marqués « HIGH ACTIVITY ». Il est recommandé que le commentaire suivant accompagne tout résultat de chaînes légères libres rendu.

« Un excès d'antigène non détecté est un événement rare, mais ne peut être exclu. Si les résultats en chaînes légères libres ne sont pas en accord avec d'autres résultats cliniques ou de laboratoire, ou si l'échantillon provient d'un patient qui a déjà démontré un excès d'antigène, le résultat doit être vérifié par un nouveau test à une dilution plus élevée. »

## 9 CONTROLE DE QUALITE

Les contrôles fournis doivent être utilisés dans chaque série. Les concentrations en lambda libre des contrôles sont indiquées sur le feuillet supplémentaire du coffret (SIN123.DS). Les résultats obtenus au cours du test ne doivent être pris en compte que si les résultats des contrôles sont à  $\pm 20\%$  des valeurs indiquées. Si la valeur d'un contrôle est en dehors des limites acceptables en utilisant une courbe en mémoire, il est nécessaire de faire une nouvelle calibration. Si après une nouvelle calibration, les valeurs du contrôle sont toujours en dehors des limites, l'instrument doit être vérifié et le test répété. Si le problème persiste contacter le fournisseur.



## 10 LIMITES

- 10.1** Les tests en turbidimétrie ne sont pas applicables pour des échantillons hautement lipidiques, hémolysés ou pour des échantillons contenant des taux élevés de complexes immuns circulants, à cause du degré imprévisible de déviation de lumière non spécifique que de tels échantillons peuvent générer. Des résultats inattendus doivent être confirmés en utilisant une autre méthode. Une interférence est possible en cas de présence de facteur Rhumatoïde (voir Section 12.6).
- 10.2** Un diagnostic ne peut pas être fait et un traitement ne peut pas être donné uniquement sur la base des mesures de chaînes légères libres. L'histoire clinique du patient ainsi que d'autres analyses doivent être prises en considération.
- 10.3** **Excès d'Antigène** : Voir Section 8.6.
- 10.4** Les ChLL possèdent une combinaison unique d'acides aminés. Ainsi, il est théoriquement possible que certaines protéines monoclonales soient indétectables par immunoessai, provoquant des résultats plus faibles que prévus. En pratique cela ne se produit que très rarement avec le test **Freelite**. Les échantillons suspects d'être en excès d'antigène et non détecté par l'instrument doivent être testés à une dilution supérieure afin d'éviter tout excès d'antigène (voir section 8.6). Cela doit être étayé par d'autres investigations utilisant d'autres techniques de laboratoire (immunofixation et électrophorèse des protéines sériques).
- 10.5** Dans les essais immunoenzymatiques, la nature des protéines monoclonales peut causer une réponse non linéaire et, potentiellement donner des résultats contradictoires. Ceci peut être évité en diluant les échantillons comme suit : 1:1, 1:10, 1:100 (Initial, Facteur B, Facteur A sur l'Integra 400/400plus ou 'Initial' sur l'Integra 800 - voir paragraphe 8.5). Il est vivement recommandé de ne pas sauter ou omettre une de ces dilutions.
- 10.6** La nature des protéines monoclonales est très variable, c'est pourquoi des lots de réactifs différents peuvent réagir différemment aux épitopes présents dans certains sérums. Dans ce cas, les résultats d'un sérum peuvent varier s'ils ont été obtenus sur des lots différents. En suivi de patients, les résultats doivent être interprétés avec précaution si les lots sont différents. Nous recommandons, dans la mesure du possible, d'utiliser un même lot lorsque plusieurs échantillons doivent être comparés.
- 10.7** Des tests de réactions non-spécifiques ont démontré qu'un certain nombre d'autres de chimies peuvent interférer avec les tests **Freelite** kappa lorsqu'ils sont testés en mode "Random". C'est pourquoi, les utilisateurs doivent lancer tous les tests **Freelite** en mode "Batch" comme détaillé dans la section 8.4.1. Omettre cet avertissement résultera en une élévation des résultats **Freelite** kappa et dans un mauvais rapport Kappa/Lambda. Ces tests ont aussi démontrés que les tests **Freelite** n'interfèrent pas avec d'autres chimies. Contacter votre revendeur pour plus d'information.

## 11 VALEURS ATTENDUES

Les gammes indiquées ont été obtenues à partir d'un nombre limité d'échantillons et sont données à titre indicatif. Il est fortement recommandé d'établir ses propres normes.

### 11.1 Gammes sériques adultes

Ces gammes ont été obtenues en mesurant les concentrations en chaînes légères de 282 sujets d'adultes sains âgés de 20 à 90 ans en utilisant les coffrets **Freelite** Binding Site sur un BN™II<sup>(\*)</sup>. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Sérums d'adultes sains	Conc. moy.	Conc. médiane	Gamme 95 percentile
Kappa libre	8,36 (mg/L)	7,30 (mg/L)	3,30 - 19,40 (mg/L)
Lambda libre	13,43 (mg/L)	12,40 (mg/L)	5,71 - 26,30 (mg/L)
	<b>Moyenne</b>	<b>Médiane</b>	<b>Gamme</b>
Rapport kappa/lambda	0,63	0,60	0,26 - 1,65

Afin de démontrer l'équivalence des gammes normales obtenues avec le BNII et l'Integra, 50 échantillons provenant de donneurs normaux à âgés de 20 à 60 ans ont été testés sur ces deux appareils, en utilisant les coffrets **Freelite** correspondant à chaque appareil. Les résultats sont résumés dans la section « Sérums normaux » du paragraphe 12.8.

\*BN™ est une marque déposée du Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.

## 12 PERFORMANCE

Une étude de précision a été réalisée en suivant la procédure du NCCLS *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Approved Guideline* (NCCLS Document EP5-A). Cette étude a été menée sur l'Integra 400 à une fréquence de deux tests par jour pendant 21 jours. 3 sérums et 3 lots de réactifs différents ont été testés sur un appareil.

### 12.1 Précision intra-essai

	Lambda libres		
	Moyenne (mg/L)	SD	CV %
Sérum 1	7,72	0,17	2,3
Sérum 2	27,0	0,18	0,7
Sérum 3	99,2	0,72	0,7

### 12.2 Précision inter-essai

	Lambda libres		
	Moyenne (mg/L)	SD	CV %
Sérum 1	7,72	0,19	2,5
Sérum 2	27,0	0,21	0,8
Sérum 3	99,2	0,73	0,7

### 12.3 Précision inter-jour

	Lambda libres		
	Moyenne (mg/L)	SD	CV %
Sérum 1	7,72	0,29	3,7
Sérum 2	27,0	0,42	1,5
Sérum 3	99,2	1,60	1,6

### 12.4 Précision totale

	Lambda libres		
	Moyenne (mg/L)	SD	CV %
Sérum 1	7,72	0,39	5,0
Sérum 2	27,0	0,50	1,9
Sérum 3	99,2	1,90	1,9

### 12.5 Linéarité

La linéarité de ce test a été confirmée en utilisant des dilutions en série d'un sérum polyclonal. L'équation de régression obtenue est  $y = 1,004x - 1,123$  (mg/L),  $r = 1,00$  ( $y$  = concentration mesurée de lambda libres,  $x$  = concentration théorique).

## 12.6 Interférences

Des interférences minimales ont été trouvées avec la bilirubine à 200mg/L (-1,7%), l'hémoglobine à 5,7g/L (3,8%), les intralipides à 0,5% (-1,9%) en utilisant un sérum de contrôle lambda libres à 8,0mg/L. De minimales interférences (+3,3%) ont été observées avec du facteur rhumatoïde à 480 UI/mL en utilisant un sérum avec 18mg/L de chaîne légère libre lambda.

## 12.7 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique de ce test (1,3mg/L) a été démontrée en mesurant 10 replicats de deux échantillons de sérums humains poolés de concentrations équivalentes au sommet de la courbe de calibration et variant de 140% à 200% par rapport à ce point. Deux groupes distincts de résultats ont été obtenus.

## 12.8 Comparaison

50 sérums adultes normaux et 82 sérums adultes cliniques (connus ou suspectés comme ayant atteints de myélome multiple ou de lupus érythémateux disséminé) ont été testés sur un Integra et un BNII. Les résultats sont les suivants :

Gamme (mg/L)	Sérum Normal	Sérum Clinique
3 – 19mg/L	1,0 – 18700mg/L	
Regression de Passing Bablock	$y = 1,08x - 1,09$	$y = 0,9988x - 0,7282$
Regression linéaire $R^2$	$R^2 = 0,9351$	$R^2 = 0,9673$

## 13 BIBLIOGRAPHIE

- Cole PW, Durie BGM, Salmon SE (1978). Immunoquantitation of free light chain immunoglobulins: Application in multiple myeloma. *J. Immunol. Meth.* **19**: 341-349.
- Pescali E, Pezozoli A (1988). The clinical spectrum of pure Bence-Jones proteinuria. *Cancer* **61**: 2408-2415.
- Solling K, Solling J, Romer FK (1981). Free light chains of immunoglobulins in Serum from patients with rheumatoid arthritis, sarcoidosis, chronic infections and pulmonary cancer. *Acta. Med. Scand.* **209**: 473-477.
- Drayson MT, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith HD and Bradwell AR (2001). Serum free light chain measurements for identifying and monitoring patients with non-secretory multiple myeloma. *Blood* **97**: 2900-2902.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT and Drew RL (2001). Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in Serum and urine. *Clin. Chem.* **47**: 4, 673-680.
- Tang LX, Showell P, Carr-Smith HD, Mead GP, Drew R and Bradwell AR (2000). Evaluation of F(ab')<sub>2</sub>-based latex-enhanced nephelometric reagents for free immunoglobulin light chains on the Behring Nephelometer™ II. *Clin. Chem* **46**: 6, Suppl. 2000: 705, pA181.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC and Drayson MT (2003). Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* **361**: 489-491.
- Abraham RS, Katzman JA, Clark RJ, Bradwell AR, Kyle RA and Gertz MA (2003). Quantitative Analysis of Serum Free Light Chains: A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. *Am. J. Clin. Pathol.* **119**: (2): 274 – 278.
- Lachmann HJ, Gallimore JR, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB and Hawkins PN (2003). Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating immunoglobulin free light chains following chemotherapy. *Brit. J. Haem.* **122**: 78-84.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP and Drayson MT (2002). Serum free light chain immunoassays and their clinical application. *Clinical and Applied Immunology Reviews* **3**: 17 – 33.
- Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell, AR and Kyle RA (2002). Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin. Chem.* **48**: 1437-1444.
- Bradwell AR (2009). Serum Free Light Chain Analysis, 5<sup>th</sup> Edition. Publ. The Binding Site Ltd, Birmingham, UK.
- Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, Morgan GJ, Child JA and Bradwell AR (2004). Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *Brit. J. Haematol.* **126**, 348-354.

1	Aplicación
2	Resumen y explicación
3	Principio
4	Reactivos
5	Precauciones
6	Almacenamiento y estabilidad
7	Obtención de muestras y preparación
8	Metodología
9	Control de calidad
10	Limitaciones del procedimiento
11	Valores esperados
12	Características del rendimiento
13	Bibliografía

## Kit Lambda Libre Humana Freelite® para uso en el Cobas Integra® de Roche

Para uso diagnóstico *in-vitro*

Código de producto: LK018.RI

Producto fabricado por:

The Binding Site Group Ltd., 8 Calthorpe Road, Edgbaston, Birmingham B15 1QT, UK  
www.bindingsite.co.uk

The Binding Site Spain S.L.U.,  
C/ Balmes 243 4º 3ª, 08006 Barcelona  
Teléfono 902027750

Fax: 902027752  
e-mail: info@bindingsite.es  
web: www.bindingsite.es

En Europa y en los Estados Unidos, **Freelite®** es una marca registrada de The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK.  
Cobas Integra® es una marca registrada del grupo Roche, Alemania.



### 1 APLICACIÓN

Este kit tiene como objetivo la cuantificación en suero de las cadenas ligeras libres Lambda en el Cobas Integra 400 y 400plus y 800 de Roche. El análisis de las distintas cantidades de cadenas ligeras libres es de gran ayuda en el diagnóstico y monitorización del mieloma múltiple, neoplasias linfocíticas, la macroglobulinemia de Waldenström, AL amiloidosis, síndrome de deposición de cadenas ligeras y enfermedades del tejido conjuntivo como por ejemplo el lupus eritematoso sistémico, junto con otras determinaciones clínicas y de laboratorio.

### 2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las moléculas de inmunoglobulinas se componen de dos cadenas pesadas idénticas ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  o  $\mu$ ) que definen el tipo de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras idénticas ( $\kappa$  o  $\lambda$ ). Cada cadena ligera está unida covalentemente a una cadena pesada y las dos cadenas pesadas están entre sí enlazadas covalentemente en la región bisagra. En el suero de individuos sanos la mayoría de las cadenas ligeras se presentan ligadas a la cadena pesada. Sin embargo, también se encuentran niveles bajos de cadenas ligeras en el suero de individuos sanos, ya que las células plasmáticas las producen y segregan en exceso. El peso molecular de ambas cadenas ligeras es de aproximadamente 22,5kD. En el suero se encuentra la cadena ligera libre Kappa ( $\kappa$ ) mayormente como monómero, la cadena ligera libre Lambda ( $\lambda$ ) como dímero covalentemente ligado, con un peso molecular de aproximadamente 45kD. Esto conlleva a índices de filtración glomerular distintos para  $\kappa$  y  $\lambda$ , lo que podría ser una posible explicación de la relación  $\kappa / \lambda$  de 0,625 en el suero comparada con la relación  $\kappa$  ligada /  $\lambda$  ligada de 2,0.

Una concentración elevada de las cadenas ligeras libres monoclonales en suero está asociada con la proliferación maligna de células plasmáticas (por ejemplo mieloma múltiple), amiloidosis AL y el depósito de cadenas ligeras libres. Con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (SLE), pueden aparecer concentraciones elevadas de cadenas ligeras libres policlonales en suero<sup>(1-11)</sup>.

### 3 PRINCIPIO

La evaluación de la concentración de un antígeno soluble por turbidimetría implica la adición de la muestra a una solución que contiene el anticuerpo adecuado en una cubeta de reacción. Se hace pasar un haz de luz a través de la cubeta que se dispersa a medida que la reacción antígeno-anticuerpo tiene lugar y se forman los complejos inmunes insolubles. La dispersión de la luz se monitoriza midiendo la disminución de la intensidad del haz de luz incidente. El anticuerpo en la cubeta se encuentra en exceso por lo que la cantidad de complejos inmunes formados es proporcional a la concentración de antígeno. Se analizan inicialmente una serie de calibradores de concentración de antígeno conocida para producir una curva de calibración de dispersión de luz medida versus concentración de antígeno. De este modo pueden ensayarse muestras de concentración desconocida de antígeno y determinarse dicha concentración utilizando la curva de calibración.

La sensibilidad de los tests turbidimétricos puede aumentar con el uso de partículas de látex<sup>(6)</sup>. Esto comporta la unión del anticuerpo a una partícula de tamaño adecuado para obtener el aumento de la difusión del rayo de luz durante la reacción antígeno-anticuerpo.

### 4 REACTIVOS

- 4.1 **Reactivo látex:** anticuerpo monoespecífico, el cual se ha fijado a partículas látex poliestireno. Conservante incluido: 0,05% de ProClin™\*, 0,1% de ácido E-amino-n-caproico (EACA) y 0,01% de benzamidina.
- 4.2 **Calibradores y controles:** sueros humanos normales con cadenas ligeras libres policlonales Lambda. Se suministran en forma líquida estable. Conservante: 0,099% de azida sódica, 0,1% de ácido EACA y 0,01% de benzamidina.
- 4.3 **Reactivo suplementario:** conservante: 0,099% de azida sódica.

\*ProClin™ es una marca de Rohm and Haas Corp., Philadelphia, PA.

### 5 PRECAUCIONES

Los sueros humanos suministrados en el kit han sido sometidos a screening para donantes, resultando negativos a la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B y a la presencia de los anticuerpos de la ante los virus HIV1, HIV2 y HCV. Las técnicas usadas están aprobadas por la FDA (USA) o para el diagnóstico *in vitro* por la UE (Directiva 98/79/EC, Anexo II). Sin embargo los sobredichos ensayos no garantizan la ausencia de agentes infecciosos. **Por lo tanto, deben tratarse los reactivos como potencialmente infecciosos. Tanto la manipulación como los métodos de eliminación de desechos deberán realizarse conforme a la normativa de materiales infecciosos** y solo personal adecuadamente instruido deberá efectuar el test.

Los componentes del kit contienen azida sódica y ProClin 300 y deben ser manipulados con precaución; use guantes y vestuario protector adecuado en todo momento al manipular este producto. No trague ni permita el contacto con la piel o las mucosas (especialmente si hay heridas). En caso de contacto, lave con abundante agua y consulte a un médico. Con el plomo y el cobre pueden formarse azidas metálicas explosivas. Cuando se elimine el reactivo, lave con mucha agua los recipientes para evitar la acumulación de azida.

El presente producto debe ser utilizado por personal especializado. Se recomienda observar estrictamente el procedimiento indicado. No se garantizan resultados válidos obtenidos utilizando parámetros diferentes que los indicados.

Los reactivos de diferentes lotes **NO** son intercambiables. En caso de realizar un número elevado de tests, averigüe que todos los reactivos sean del mismo lote.

## 6 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Los kits no abiertos deben conservarse a 2-8°C y se pueden usar hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja. **NO CONGELAR.** El látex y el reactivo suplementario pueden conservarse en el pack C hasta tres meses en el analizador después de la apertura. El calibrador y los controles pueden conservarse a 2-8°C hasta tres meses después de la apertura, tomando precauciones para evitar la evaporación y el riesgo de contaminación.

## 7 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Utilizar siempre suero fresco o congelado. Las muestras de sangre deben proceder de extracciones venosas, dejadas coagular naturalmente. Separe el suero lo más rápidamente posible para evitar hemólisis. El suero debe conservarse a 2-8°C si el ensayo se ejecuta dentro de 21 días. Para periodos más largos, se recomienda conservar el suero a -20°C o temperatura inferior. No congelar y descongelar los sueros más de una vez. Evitar el uso de sueros lipémicos, hemolizados o contaminados por microbios o partículas.

## 8 METODOLOGÍA

Nota: Con el fin de poder realizar una interpretación completa de los resultados, se debería determinar la relación Kappa libre/Lambda libre. Por lo tanto las muestras deberían analizarse también con el kit **Freelite** cadenas ligeras libres Kappa de Binding Site (LK016.RI).

### 8.1 Material suministrado

- 8.1.1 1 x 100 ensayos *Human Lambda Free Reagent (R2)* (Reactivo Lambda libre humana, R2)
- 8.1.2 1 x 100 ensayos *Lambda Free Supplementary Reagent (R1)* (Reactivo suplementario Lambda libre, R1)
- 8.1.3 2 x 2mL *Human Lambda Free Standard* (Calibrador Lambda libre humana)
- 8.1.4 2 x 1,5mL *Human Lambda Free Control* (Control Lambda libre humana)
- 8.1.5 2 x 1,5mL *Human Lambda Free High Control* (Control alto Lambda libre humana)
- 8.1.6 1 x herramienta de apertura azul de Roche
- 8.1.7 1 x caja pack C Roche con código de barras

### 8.2 Transferir R1 y R2 en el pack C (ver Figura 1).

- 8.2.1 Transfiera el reactivo Lambda libre (R2) en la posición B (la botella al lado derecho con el código de barras de cara al usuario) y ponga el cierre de seguridad con ayuda de la herramienta de apertura azul de Roche.
- 8.2.2 Transfiera el reactivo suplementario Lambda libre (R1) en la posición A (botella central) y ponga el cierre de seguridad con ayuda de la herramienta de apertura azul de Roche.
- 8.2.3 Deje vacía la posición C sin cierre.

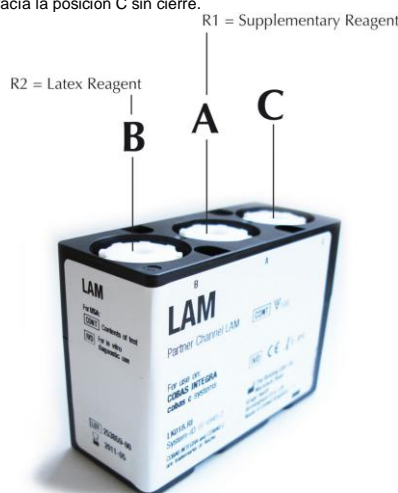


Figura 1: Transferencia de reactivos al pack C.

**NB: Sólo para Integra 800.** Una vez cargados en el analizador, los packs C deben permanecer cargados hasta que se haya usado la totalidad de los 100 tests. La previa retirada de los packs C tendrá como resultado la pérdida de los tests que no se hayan utilizado.

### 8.3 Materiales necesarios no suministrados con el kit

- 8.3.1 Equipamiento de laboratorio para la recolección y preparación de muestras p.ej. probetas para las muestras, (p.ej. de 650µL de Cobas) centrífuga, etc.
- 8.3.2 Un Integra 400/400plus/800 completamente equipado y operativo con diluyente NaCl al 9% (código de producto Roche 20756350) cargado en el rack ISE.
- 8.3.3 **Sólo para Integra 800:** Cinta Limpiadora Cobas Integra (CLEAN), Cat. No. 20764337, Sistema ID 07 6433 7.

### 8.4 Procedimiento de la prueba

El usuario deberá estar familiarizado con el aparato Integra 400/400plus/800 antes de realizar la prueba. Asegúrese de que se haya cargado el TASU (Test Application SW Update) más reciente.

- 8.4.1 Para evitar valores de arrastre de otras sustancias químicas, los tests **Freelite** se deben usar juntos y ejecutarse independientemente de otras pruebas. Se debe realizar un lavado previo a la ejecución en lote para eliminar cualquier sustancia interferente que pueda afectar el resultado de **Freelite**.

En el Integra 800, asegúrese de que se configuran los siguientes parámetros para el ensayo **Freelite Kappa**

- a) Seleccionar Configuration – Processing – Extra Wash Cycles
- b) En el siguiente espacio vacío, marcar Active y seleccionar All (tests) carries over to KAP y seleccionar la cassette "CLEAN" como limpiador.
- c) En los comentarios, introducir ALL/KAP/CLEAN

En el Integra 400/400plus

Ejecute las acciones de desproteinización "beginning of day (BOD)" y "prime fluid system".

- 8.4.2 Para ejecutar los tests **Freelite**, los reactivos se deben colocar en la cassette pack C de Roche (como se muestra en la imagen superior). Cada pack C tiene un código de barras único que identifica el analizador, que permite que sólo 100 tests se aspiren. Luego se debe desechar la cassette.

- 8.4.3 Los usuarios deben usar volúmenes exactos de estándar y controles tal y como se indica a continuación:

- Usar 450µL de estándar Lambda Libre por calibración en un tubo de muestras.
- Usar 150µL de Control Lambda Libre por test en un tubo de muestras.
- Usar 150µL de Control Alto Lambda Libre por test en un tubo de muestras.

El no alícuotar volumen de calibrador suficiente en un tubo de muestras tendrá como resultado el malgasto de 12 tests.

Existen a su disposición instrucciones completas de implementación del kit **Freelite** para los analizadores Integra 400/400plus/800. Para más información póngase en contacto con su distribuidor de Binding Site.

### 8.5 Rango de medición

**Integra 400 y 400plus:** Todas las muestras se deben analizar primero a la dilución inicial de 1/8, dando un rango de medición aproximado de 5,2-139mg/L. También hay diluciones alternativas de reensayo, conocidas como Factor A, Factor B y Factor D; con Factor D, la sensibilidad del ensayo se reduce a 1,3mg/L. El límite superior del rango de medición usando Factor A es 13900mg/L; para muestras con una mayor concentración, haga una pre-dilución manual de 1/10. A continuación se muestra un cuadro resumen:

Factor	Dilución en Integra	Dilución total	Pre-dilución manual	Rango aproximado (mg/L)
D	4	1:2	-	1,3 – 34,7
Inicial	1:1	1:8	-	5,2 – 139
B	1:10	1:80	-	52 – 1390
A	1:100	1:800	-	520 – 13900
A	1:100	1:8000	1/10*	5200 - 139000

\*Haga una pre-dilución manual de 1/10 y tomando 100µL de muestra y añadir 900µL de suero fisiológico salino normal (0,9%). Analizar la muestra diluida al 1/10 usando el Factor A. Multiplicar el resultado x 10.

**Integra 800:** Todas las muestras se deben analizar primero a la dilución inicial de 1/8, dando un rango de medición aproximado de 5,2-139mg/L. También hay diluciones alternativas de reensayo, conocidas como "Dilute" y "Concentrate". Con "Concentrate" la sensibilidad del ensayo se reduce a 1,3mg/L. El límite superior del rango de medición al usar "Dilute" es 1390mg/L. Para muestras con una concentración mayor haga una pre-dilución manual de 1/100 y analícelas a la dilución establecida por defecto.

Acción posterior	Dilución en Integra	Dilución total	Pre-dilución manual	Rango Aproximado (mg/L)
"Concentrate"	4	1:2	-	1,3 – 34,7
Inicial	1:1	1:8	-	5,2 – 139
"Dilute"	1:10	1:80	-	52 – 1390
Dilución manual	1:1	1:800	1/100**	520 - 13900
Dilución manual (repetición automática)	1:10	1:8000	1/100**	5200 - 139000

\*\*Haga una pre-dilución manual de 1/100 cogiendo 100µL de muestra y añada 900µL de suero fisiológico salino normal (0,9%) para conseguir una dilución inicial de 1/10. A partir de aquí, coja 100µL de esta dilución y añada 900µL de suero fisiológico salino normal (0,9%) para conseguir una dilución final de 1/100. Analice la muestra diluida a 1/100. Multiplique el resultado x 100.

### 8.6 Exceso de antígeno

Todos los ensayos nefelométricos son susceptibles de mostrar exceso de antígeno en muestras con concentraciones elevadas, teniendo como consecuencia resultados bajos falsos. La composición aminoácida de las cadenas ligeras producidas durante una condición patológica de la célula B influirá el nivel, en correspondencia del cual, una muestra puede evidenciar, con el ensayo **Freelite**, un exceso de antígeno. El Integra monitoriza la reacción cinética inicial de cada muestra y compara los resultados con los límites de reacción establecidos mediante el análisis de una extensa variedad de mielomas. Las muestras en las que se detecta exceso se marcan con "HIGH ACTIVITY" en los resultados y se deben volver a medir con una dilución de muestra superior para eliminar el exceso de antígeno (ver Sección 8.5). En el Integra 400/400plus se deben volver a medir las muestras a la dilución no estándar de 1:10 (Factor B) y luego a la 1:100 (Factor A) si se requiere. En el Integra 800 se vuelven a medir las muestras en las condiciones de reensayo "Dilute" y con una pre-dilución manual de 1/100 si es preciso.

**Aviso importante:** Un porcentaje bajo de muestras con exceso de antígeno pueden tener una cinética de reacción, de modo que no provocarán una marca "HIGH ACTIVITY". Se recomienda que se adjunte lo siguiente a todos los resultados de cadenas ligeras libres.

*"La falta de detección del exceso de antígeno es poco habitual pero no se puede descartar. Si estos resultados de cadenas ligeras libres no concuerdan con otras determinaciones clínicas y de laboratorio, o si la muestra proviene de un paciente que ha demostrado previamente exceso de antígeno, el resultado se debe comprobar volviendo a analizar la muestra a una dilución más alta."*

## 9 CONTROL DE CALIDAD

Los controles suministrados se deben incluir en todas las ejecuciones del ensayo. La concentración de Lambda libre correspondiente está indicada en Hoja de Datos de Producto que acompaña al kit (SIN123.DS). Los resultados deben ser sólo aceptados si los controles no se desvían más de ±20% de las concentraciones indicadas.

En caso de que un control dé un resultado fuera del rango y se haya empleado una curva de calibración almacenada, se debe calibrar de nuevo el test. Si aún después de la nueva calibración estuviera fuera de rango, deberá verificarse el instrumento. Si no se solucionara el problema, rogamos se dirijan a su proveedor.

## 10 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 10.1 Los tests turbidimétricos no son adecuados para la determinación de muestras altamente lipémicas o hemolíticas o muestras que contengan niveles altos de complejos inmunes circulantes, dado que estas muestras pueden producir una cantidad impredecible de luz dispersa no especificable. Los resultados no previstos deberán verificarse con un método alternativo. Existe la posibilidad de interferencias debido a la presencia del factor reumatoide (ver Sección 12.6).

- 10.2 No debe realizarse el diagnóstico ni iniciarse un tratamiento basándose únicamente en la medida de la cadena ligera libre, deben tenerse en cuenta también la historia clínica y resultados de otras pruebas de laboratorio.

- 10.3 Exceso de antígeno:** Ver Sección 8.6.
- 10.4** Cada CLL contiene combinaciones únicas de aminoácidos. Por lo tanto es posible que algunas proteínas monoclonales sean indetectables por inmunoensayo, teniendo como consecuencia mediciones inferiores a las esperadas. En la práctica esto ocurre en raras ocasiones con el análisis **Freelite**. Las muestras con las que haya sospecha de exceso de antígeno y que no detecte el analizador deben volverse a analizar a una dilución más alta para detectar el exceso de antígeno (ver Sección 8.6). Posteriormente deben someterse estas muestras a análisis adicionales (inmunofijación y electroforesis de proteínas séricas).
- 10.5** La naturaleza de las proteínas monoclonales puede ocasionar una respuesta no lineal en inmunoensayos, pudiendo llevar a resultados inconsistentes; esto se puede prevenir diluyendo siempre las muestras en la secuencia 1:1, 1:10, 1:100 (Inicial, Factor B, Factor A en el Integra 400/400plus o "Initial", "Dilute" en el Integra 800 – ver Sección 8.5). Se debe evitar la omisión de algún paso de dilución o el uso de diluciones alternativas.
- 10.6** Debido a la naturaleza altamente variable de las proteínas monoclonales, los reactivos de diferentes lotes podrían reaccionar de distintas formas a los epitopos en algunas muestras. En estos casos, los resultados podrían variar al usar múltiples lotes. Se debe extremar la precaución al monitorizar pacientes con reactivos de lotes distintos. Se recomienda, siempre que sea posible, que se analicen las muestras actuales y antiguas con los lotes nuevos y que se comparen los resultados.
- 10.7** Experimentos de arrastre han demostrado que ciertas sustancias químicas pueden interferir con los resultados de Kappa libre cuando se ejecutan en modo de acceso aleatorio. Por lo tanto, los usuarios deben ejecutar los análisis **Freelite** en lote tal y como se indica en la Sección 8.4.1. No hacerlo puede llevar a una elevación del resultado de Kappa libre y a la distorsión del ratio Kappa/Lambda. Las investigaciones de arrastre han demostrado que los análisis **Freelite** no interfieren con otras sustancias químicas. Para más información póngase en contacto con su distribuidor de Binding Site.

## 11 VALORES ESPERADOS

Los rangos indicados a continuación están basados en un número limitado de muestras y son orientativos. Se recomienda, cuando sea posible, calcular los rangos normales locales.

### 11.1 Rangos de valores en suero de adultos

282 individuos sanos de edades comprendidas entre 20 y 90 años se sometieron a las pruebas realizadas mediante el análisis **Freelite** de Binding Site para BN™II\*. Los resultados se muestran a continuación en la tabla inferior.

Suero adulto normal	Conc. media	Conc. mediana	Rango percentil 95
Kappa libre	8,36 (mg/L)	7,30 (mg/L)	3,30 - 19,40 (mg/L)
Lambda libre	13,43 (mg/L)	12,40 (mg/L)	5,71 - 26,30 (mg/L)
	<b>Media</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango total</b>
Relación Kappa/Lambda	0,63	0,60	0,26 - 1,65

Para demostrar la equivalencia del rango normal obtenido con los tests **Freelite** BNII e Integra, se analizaron con ambos kits 50 muestras normales de donantes del Reino Unido de edades comprendidas entre los 20 y 60 años. Hay un resumen de los resultados debajo de "Sueros Normales" en la Sección 12.8.

\*BN™ es una marca de Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.

## 12 CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Se ha llevado a cabo un estudio de precisión siguiendo las pautas "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Approved Guideline" de la NCCLS (Documento NCCLS EP5-A). El estudio se llevó a cabo durante 21 días, con dos series al día. Un usuario midió los resultados de tres muestras diferentes usando tres lotes de reactivos diferentes en el analizador Integra 400.

### 12.1 Precisión intra-ensayo

	CLL Lambda		
	Valor medio (mg/L)	SD	CV %
Suero 1	7,72	0,17	2,3
Suero 2	27,0	0,18	0,7
Suero 3	99,2	0,72	0,7

### 12.2 Precisión inter-ensayo (muestras evaluadas en el mismo día)

	CLL Lambda		
	Valor medio (mg/L)	SD	CV %
Suero 1	7,72	0,19	2,5
Suero 2	27,0	0,21	0,8
Suero 3	99,2	0,73	0,7

### 12.3 Precisión inter-ensayo (muestras evaluadas en días diferentes)

	CLL Lambda		
	Valor medio (mg/L)	SD	CV %
Suero 1	7,72	0,29	3,7
Suero 2	27,0	0,42	1,5
Suero 3	99,2	1,60	1,6

### 12.4 Precisión total

	CLL Lambda		
	Valor medio (mg/L)	SD	CV %
Suero 1	7,72	0,39	5,0
Suero 2	27,0	0,50	1,9
Suero 3	99,2	1,90	1,9

### 12.5 Linealidad

La linealidad de los análisis se confirmó analizando diluciones seriadas de muestras de suero policlonales; dando una recta de regresión:  $y = 1,004x - 1,123$  (mg/L),  $r = 1,00$  ( $y$  = concentración medida de Lambda libre,  $x$  = concentración teórica).

### 12.6 Sustancias interferentes

En medidas de un control en suero de 8,0mg/L de Lambda libre, se encontraron interferencias insignificantes con 200mg/L de bilirrubina (-1,7%), 5g/L de hemoglobina (3,8%) y 0,5% de intralipidos (-1,9%). Se ha demostrado una interferencia mínima (+3,3%) de 480 IU/mL de factor reumatoide usando muestras de suero que contenían 18mg/L de lambda libre.

## 12.7 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (1,3 mg/L) se determinó analizando diez réplicas de dos muestras con concentraciones de lambda libre equivalentes al 140% y 200% de este valor. Se generaron dos conjuntos de datos diferentes que no se solaparon.

## 12.8 Estudio comparativo

Se analizaron 50 muestras de individuos sanos y 82 muestras de casos clínicos (procedentes de pacientes con mieloma múltiple diagnosticado o sospechado y pacientes con lupus eritematoso sistémico) usando los kits **Freelite** para Integra y **Freelite** para BNII. Los resultados fueron los siguientes:

	Suero normal	Suero de casos clínicos
Rango (mg/L)	3 – 19mg/L	1.0 – 18700mg/L
Regresión Passing Bablock	$y=1,08x - 1.09$	$y=0,9988x - 0,7282$
Regresión lineal R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> =0,9351	R <sup>2</sup> =0,9673

## 13 BIBLIOGRAFÍA

- Cole PW, Durie BGM, Salmon SE (1978). Immunoquantitation of free light chain immunoglobulins: Application in multiple myeloma. J. Immunol. Meth. **19**: 341-349.
- Pescali E, Pezozoli A (1988). The clinical spectrum of pure Bence-Jones proteinuria. Cancer **61**: 2408-2415.
- Solling K, Solling J, Romer FK (1981). Free light chains of immunoglobulins in serum from patients with rheumatoid arthritis, sarcoidosis, chronic infections and pulmonary cancer. Acta. Med. Scand. **209**: 473-477.
- Drayson MT, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith HD and Bradwell AR (2001). Serum free light chain measurements for identifying and monitoring patients with non-secretory multiple myeloma. Blood **97**: 2900-2902.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT and Drew RL (2001). Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. Clin. Chem. **47**: 4, 673-680.
- Tang LX, Showell P, Carr-Smith HD, Mead GP, Drew R and Bradwell AR (2000). Evaluation of F(ab')<sub>2</sub>-based latex-enhanced nephelometric reagents for free immunoglobulin light chains on the Behring Nephelometer™ II. Clin. Chem **46**:6, Suppl. 2000, 705, pA181.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC and Drayson MT (2003). Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. Lancet **361**: 489-491.
- Abraham RS, Katzman JA, Clark RJ, Bradwell AR, Kyle RA and Gertz MA (2003). Quantitative Analysis of Serum Free Light Chains: A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. Am. J. Clin. Pathol. **119**: (2): 274 – 278.
- Lachmann HJ, Gallimore JR, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB and Hawkins PN (2003). Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating immunoglobulin free light chains following chemotherapy. Brit. J. Haem. **122**: 78-84.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP and Drayson MT (2002). Serum free light chain immunoassays and their clinical application. Clinical and Applied Immunology Reviews **3**: 17 – 33.
- Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell, AR and Kyle RA (2002). Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. Clin. Chem. **48**: 1437-1444.
- Bradwell AR (2009). Serum Free Light Chain Analysis, 5<sup>th</sup> Edition. Publ. The Binding Site Ltd, Birmingham, UK.
- Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, Morgan GJ, Child JA and Bradwell AR (2004). Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. Brit. J. Haematol. **126**, 348-354.