

**Freelite® Human Kappa Free kit**  
**For use on the HITACHI**  
**911/912/917/Modular P**

**1** CONTENTS

Page no.

<b>1</b>	Intended use
<b>2</b>	Summary and explanation
<b>3</b>	Principle
<b>4</b>	Reagents
<b>5</b>	Caution
<b>6</b>	Storage and stability
<b>7</b>	Specimen collection and preparation
<b>8</b>	Methodology
<b>9</b>	Quality control
<b>10</b>	Limitations
<b>11</b>	Expected values
<b>12</b>	Performance characteristics
<b>13</b>	Bibliography

Deutsch  
 Français  
 Español

Siehe Seite  
 Cf. page  
 Página

**For *in-vitro* diagnostic use**

**Product Code: LK016.H**

*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

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



**1 INTENDED USE**

This kit is intended for the quantitation of kappa free light chains in serum and urine on the Roche Hitachi 911, Hitachi 912, Hitachi 917 and Modular P. 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. FLC levels in urine are low. In a healthy kidney the tubular cells selectively reabsorb all FLC so their presence in urine is probably due to secretion into the urinary tract. Elevated serum levels of monoclonal FLC are associated with malignant plasma cell proliferation (e.g. 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. The appearance of higher levels of FLC in urine may be indicative of kidney disease or malignant lymphoproliferative disease such as multiple myeloma. The monoclonal urinary FLC associated with lymphoid malignancy is called a Bence Jones protein<sup>(1-13)</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 polyclonal monospecific antibody coated onto polystyrene latex. Preservatives: 0.05% ProClin<sup>TM</sup>\*, 0.1% E-amino-n-caproic acid (EACA) and 0.01% benzamidine.
- 4.2 Standard and controls:** these consist of human sera that contain kappa 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<sup>TM</sup> 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 reagent, calibrator and control 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 or urine 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 serum or urine samples, samples containing particulate matter and lipaemic or haemolysed serum 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** Lambda Free kit (LK018.H).

### 8.1 Materials Provided

- 8.1.1 2 x 6.5mL Human Kappa Free Reagent (R2)
- 8.1.2 1 x 25mL Human Kappa Free Supplementary Reagent (R1)
- 8.1.3 2 x 1.5mL Human Kappa Free Standard
- 8.1.4 1 x 1.0mL Human Kappa Free Control Serum
- 8.1.5 1 x 1.0mL Human Kappa Free High Control Serum

### 8.2 Materials required but not provided

- 8.2.1 Equipment for collection and preparation of test samples e.g. sample tubes, centrifuge, etc.
- 8.2.2 Empty reagent bottles with barcode labels (available from Roche).
- 8.2.3 Special wash solution NaOHD, code 402 – 1822551 and 1551540 (available from Roche).
- 8.2.4 A fully operational and equipped Hitachi 911, 912, 917 or Modular P. A Hitachi 911 library disk with application codes 361-400.

### 8.3 Reagent preparation

Before loading, gently mix by inversion ensuring no foam or bubbles are generated or remain on the surface as these may interfere with reagent aspiration.

### 8.4 Test procedure

The user should be familiar with the operation of the Hitachi analyser before attempting to carry out the test procedures. The Hitachi analyser should be prepared for use according to the manufacturer's instructions and the assay protocol entered as described below.

Complete installation instructions for Hitachi 911, 912, 917 and Modular P analysers are available; please contact your local distributor for further information. Instructions denoted by an asterisk indicate a user-determined parameter.

NB: The Kappa Free assay requires the installation of a saline calibrator for Calibrator 1 and Human Kappa Free Standard as Calibrators 2-6. Install both calibrators using any unassigned calibrator numbers between 900 and 999. If a saline calibrator has already been installed on the instrument this can be assigned to the Kappa Free assay.

### 8.4.1 Parameters (Hitachi 911)

Test	[ Kappa ]	[ ***** ]	Test Name	[ Kappa ]	Unit	[ mg/L ]
Data Mode	[ On Board ]		Report Name	[ Kappa Free ]		
Control Interval	[ 0 ]		Instrument Factor (Y=aX+b)	a [ 1.0 ]	b [ 0 ]	
Expected Value (Serum)			Expected Value (Urine)			
Age (M)	[ 0 ] [ Y ]	[ 0 ] - [ 100 ]	Age (F)	[ 0 ] - [ 100 ]	[ 0 ] - [ 100 ]	
	[ 0 ] [ Y ]	[ 0 ] - [ 100 ]		[ 0 ] - [ 100 ]	[ 0 ] - [ 100 ]	
		[ 0 ] - [ 100 ]		[ 0 ] - [ 100 ]		
Technical Limit (Serum)			Technical Limit (Urine)			
	[ STD2 CONC ] - [ STD6 CONC ]			[ 0 ] - [ 100 ]		
STD Conc.	Pos.	Sample	Pre.	Dil.	Calib.	Lot No.
(1) [ 0.00 ]	34	[ 8 ]	[ 0 ]	[ 0 ]	[ 034 ]	000001
(2) [ 16.6% of Cal value ]	**	[ 10 ]	[ 8 ]	[ 290 ]	[ *** ]	000002
(3) [ 38.5% of Cal value ]	**	[ 20 ]	[ 8 ]	[ 240 ]	[ *** ]	000000
(4) [ 71.4% of Cal value ]	**	[ 20 ]	[ 8 ]	[ 120 ]	[ *** ]	000000
(5) [ 125% of Cal value ]	**	[ 40 ]	[ 8 ]	[ 120 ]	[ *** ]	000000
(6) [ 250% of Cal value ]	**	[ 50 ]	[ 8 ]	[ 50 ]	[ *** ]	000000
Test	[ Kappa ]					
Assay Code	[ 2 Point End ]	[ 10 ] [ ]	Wavelength(2nd/Primary)	[ ] [ 600 ]		
Assay Point	[ 7 ] - [ 31 ] - [ 0 ] - [ 0 ]		Diluent/Rgt. Stability	[ 00301 ] [ 0 ]		
S. Vol. (Normal)		[ 20 ] [ 8 ]	[ 80 ]	[ 1 ]	[ 0 ]	[ 0 ]
S. Vol. (Decrease)		[ 3 ] [ 8 ]	[ 147 ]	[ 1 ]	[ 0 ]	[ 0 ]
S. Vol. (Increase)		[ 8 ] [ 0 ]	[ 0 ]	[ 1 ]	[ 0 ]	[ 0 ]
ABS. Limit	[ 32000 ]	[ 32000 ]		[ Increase ]		
Prozone Limit	[ 32000 ]	[ 32000 ]		[ Upper ]		
Reagent	R1	[ 150 ]	[ 0 ]	[ ***** ]	[ 0 ]	
	R2	[ 90 ]	[ 0 ]	[ ***** ]	[ 0 ]	
	R3	[ 0 ]	[ 0 ]	[ ***** ]	[ 0 ]	
	R4	[ 0 ]	[ 0 ]	[ ***** ]	[ 0 ]	
Calibration Type	[ Logit-Log (4P) ]	[ 6 ]	[ 6 ]	[ 0 ]	[ ]	
Auto Time Out	Blank	[ 0 ]	SD Limit	[ 999 ]		
	Span	[ 0 ]	Duplicate Limit	[ 32000 ]		
	2 Point	[ 0 ]	Sensitivity Limit	[ 0 ]		
	Full	[ 0 ]	S1 ABS Limit	[ -32000 ] [ 32000 ]		
Auto Change	Lot	[ Cancel ]	Compensated Limit	[ ]		
	Bottle	[ Cancel ]				
Special Wash Programming						
Cell Wash	[ 1 ] [ Kappa ]	[ 00402 ]	[ 350 ]	- [ 00402 ]	[ 350 ]	

### 8.4.2 Parameters (Hitachi 912)

#### Application - Analyze

Select Test: [ Kappa ] Analyzer Cycle Time: [ 10 sec ] Diluent: [ 00301 ] [ 0 ]  
 Test Name: [ Kappa ] Assay/Time/Point [ 2 point end ] [ 10 ] [ 7 ] [ 31 ] [ 0 ] [ 0 ]  
 App Code [ \*\*\* ] Wavelength (2<sup>nd</sup>/Primary): [ ] [ 600 ]

#### Sample Volume

	Class 1			Class 2		
Normal:	[ 20 ] [ 8 ] [ 80 ]			[ 1 ] [ 0 ] [ 0 ]		
Decrease:	[ 3 ] [ 8 ] [ 147 ]			[ 1 ] [ 0 ] [ 0 ]		
Increase:	[ 8 ] [ 0 ] [ 0 ]			[ 1 ] [ 0 ] [ 0 ]		

#### Reagent

R1:	[ 150 ] [ 0 ] [ ***** ]	[ 0 ]	
R2:	[ 90 ] [ 0 ] [ ***** ]	[ 0 ]	
R3:	[ 0 ] [ 0 ] [ ***** ]	[ 0 ]	
R4:	[ 0 ] [ 0 ] [ ***** ]	[ 0 ]	
Abs Limit:	[ 32000 ]	[ 32000 ]	[ Increase ]
Prozone Limit:	[ 32000 ]	[ 32000 ]	[ Upper ]
Twin Test:	[ ]		

#### Application - Calibration

Select Test: [ Kappa ]  
 Calibration Type: [ Logit-Log (4p) ]  
 Point: [ 6 ] Span Point: [ 6 ]  
 Weight: [ 0 ]

#### Auto-Calibration

Time Out Change Over  
 [ ] [ ] Lot: [ ] 3D Limit: [ 999.9 ]  
 [ ] [ ] Bottle: [ ] Duplicate Limit: [ 99 ] x [ 32000 ] Abs  
 [ ] [ ] Sensitivity Range: [ -99999 ] - [ 99999 ]  
 [ ] [ ] St. Abs. Range: [ -32000 ] - [ 32000 ]

#### Application - Range

Select Test: [ Kappa ] Report Name: [ Kappa Free ] Date Mode: [ On Board ]  
 Test Name: [ Kappa ] Control Interval [ ] Unit [ mg/L ]  
 Instrument Factor : (Y=aX+b) a= [ 1.0 ] b= [ 0.0 ]  
 App Code: [ \*\*\* ]  
 Sample Type: [ Ser/PI ]

#### Expected Range

	Age	Male	Female	[ ]	Use Qualitative Tables
[ 1 ] [ Years ]	[ -99999 ]	[ 99999 ]	[ -99999 ]	[ 99999 ]	[ 1 ] [ ] [ ] [ ]
[ 50 ] [ Years ]	[ -99999 ]	[ 99999 ]	[ -99999 ]	[ 99999 ]	[ 2 ] [ ] [ ] [ ]
	[ -99999 ]	[ 99999 ]	[ -99999 ]	[ 99999 ]	[ 3 ] [ ] [ ] [ ]
					[ 4 ] [ ] [ ] [ ]
					[ 5 ] [ ] [ ] [ ]
					[ 6 ] [ ] [ ] [ ]

Default Age: [ 0 Years - 1 Years ]  
 Default Sex: [ Male ] Repeat Range: [ -99999 ] [ 99999 ]  
 Class 1 Technical Range: [ STD2 CONC ] - [ STD6 CONC ]  
 Class 2 Technical Range: [ -99999 ] [ 99999 ]

#### Application - Others

Select Test: [ Kappa ]  
 Standard: [ 1 ] [ 2 ] [ 3 ] [ 4 ] [ 5 ] [ 6 ]  
 Calib. Code: [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ]  
 Concentration  
 (% of Cal value): [ 000 ] [ 16.6% ] [ 38.5% ] [ 71.4% ] [ 125% ] [ 250% ]  
 Position: [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ]  
 Sample Volume: [ 8 ] [ 10 ] [ 20 ] [ 30 ] [ 50 ] [ 4 ]  
 Diluted S. Volume: [ 0 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 0 ]  
 Diluent Volume: [ 0 ] [ 290 ] [ 240 ] [ 180 ] [ 150 ] [ 0 ]

#### Special Wash - Edit Cell

Test: [ Kappa ]  
 R1: [ 402 ] Bottle Code: [ 402 ]  
 [ 350 ] Volume: [ 350 ]

### 8.4.3 Parameters (Hitachi 917)

#### Application - Analyze

Select Test: [ Kappa ]  
 Assay/Time/Point [ 2 point end ] [ 10 ] [ 7 ] [ 34 ] [ 0 ] [ 0 ]  
 Wavelength (2<sup>nd</sup>/Primary): [ ] [ 600 ]

#### Sample Volume

Normal:	[ 20 ] [ 8 ] [ 80 ]	R1:	[ 150 ] [ 0 ] [ ***** ]	[ 0 ]	Timing
Decrease:	[ 3 ] [ 8 ] [ 147 ]	R2:	[ 90 ] [ 0 ] [ ***** ]	[ 0 ]	
Increase:	[ 8 ] [ 0 ] [ 0 ]	R3:	[ 0 ] [ 0 ] [ ***** ]	[ 0 ]	
		R4:	[ 0 ] [ 0 ] [ ***** ]	[ 0 ]	

#### Diluent

[ ] Water  
 [ • ] Diluent [ 951 ] [ 00 ]  
 Abs Limit: [ 32000 ] [ Increase ]  
 Prozone Limit: [ 32000 ] [ 0 ] [ 0 ] [ 0 ] [ 0 ] [ Upper ]  
 Cell Detergent: [ Detergent 1 ]  
 Twin Test: [ ]

\*Open channels on the Roche Hitachi 917 can be programmed to use Roche Saline as the sample diluent. The 'Diluent' parameter found at the Maint/Utility-Application-Analyze page of the appropriate assay should be entered as '00951', the reagent code for a bottle of Roche Saline.

**Application – Calibration**

Calibration Type: [ Logit-Log (4p) ]	<u>Auto-Calibration</u>
Point: [ 6 ]	Time Out
Span Point: [ 6 ]	[ ] Blank [ ]
Weight: [ 0 ]	[ ] Span [ ]
	[ ] 2 Point [ ]
	[ ] End [ ]
SD Limit: [ 999.9 ]	<u>Change Over</u>
Duplicate Limit: [ 99 ] % [ 32000 ] Abs	Module [ ]
Sensitivity Range: [ -99999 ] - [ 99999 ]	Lot [ ]
S1. Abs. Range: [ -32000 ] - [ 32000 ]	Bottle [ ]

**Application – Range**

App Code: [ *** ]	<u>Expected Range</u>
Unit: [ mg/L ]	Male
Report Name: [ Kappa Free ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Data Mode: [ Active ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Technical Limit: [ STD2 CONC ] [ STD6 CONC ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
Repeat Limit: [ -99999 ] - [ 99999 ]	Female
[ ] Control Time Interval [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ ] Qualitative [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ 1 ] [ ] [ ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
[ 2 ] [ ] [ ]	Default
[ 3 ] [ ] [ ]	Sex:
[ 4 ] [ ] [ ]	[ • ] Male [ ] Female
[ 5 ] [ ] [ ]	Range:
[ 6 ] [ ] [ ]	[ ] Range 1 [ ] Range 2 [ ] Range 3 [ ]

**Application – Others**

Standard: [ 1 ] [ 2 ] [ 3 ] [ 4 ] [ 5 ] [ 6 ]
Calib. Code: [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ]
Concentration
(% of Cal value): [ 000 ] [ 16.6% ] [ 38.5% ] [ 71.4% ] [ 125% ] [ 250% ]
Rack No. Position: [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ]
Sample Volume: [ 8 ] [ 5 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ]
Diluted S. Volume: [ 0 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ]
Diluent Volume: [ 0 ] [ 145 ] [ 240 ] [ 120 ] [ 60 ] [ 20 ]

**Special Wash – Edit Cell**

Test	Type	R1	Volume	Type	R2	Volume
[ Kappa ]	[ D1 ]		[ 270 ]	[ D1 ]		[ 270 ]

**8.4.4 Parameters (Modular P)**

**Application - Analyze**

Select Test: [ Kappa ]	
Assay/Time/Point	
Wavelength (2 <sup>nd</sup> /Primary): [ 2 point end ] [ 10 ] [ 7 ] [ 34 ] [ 0 ] [ 0 ]	
[ ] [ 600 ]	
<u>Sample Volume</u>	<u>Reagent</u>
Normal: [ 20 ] [ 8 ] [ 80 ] R1: [ 150 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] Timing	
Decrease: [ 3 ] [ 8 ] [ 147 ] R2: [ 90 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] [ ]	
Increase: [ 8 ] [ 0 ] [ 0 ] R3: [ 0 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] [ ]	
	R4: [ 0 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] [ ]
<u>Diluent</u>	
[ ] Water	
[ • ] Diluent [ 311 ]*	
Abs Limit: [ 32000 ] [ Increase ]	
Prozone Limit: [ 32000 ] [ 0 ] [ 0 ] [ 0 ] [ 0 ] [ Upper ]	
Cell Detergent: [ Detergent 1 ]	
Twin Test: [ ]	

**Application – Calibration**

Calibration Type: [ Logit-Log (4p) ]	<u>Auto-Calibration</u>
Point: [ 6 ]	Time Out
Span Point: [ 6 ]	[ ] Blank [ ]
Weight: [ 0 ]	[ ] Span [ ]
	[ ] 2 Point [ ]
	[ ] End [ ]
SD Limit: [ 999.9 ]	<u>Change Over</u>
Duplicate Limit: [ 99 ] % [ 32000 ] Abs	Module [ ]
Sensitivity Range: [ -99999 ] - [ 99999 ]	Lot [ ]
S1. Abs. Range: [ -32000 ] - [ 32000 ]	Bottle [ ]

**Application - Range**

App Code: [ *** ]	<u>Expected Range</u>
Unit: [ mg/L ]	Male
Report Name: [ Kappa Free ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Data Mode: [ Active ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Technical Limit: [ STD2 CONC ] [ STD6 CONC ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
Repeat Limit: [ -99999 ] - [ 99999 ]	Female
[ ] Control Time Interval [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ ] Qualitative [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ 1 ] [ ] [ ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
[ 2 ] [ ] [ ]	Default
[ 3 ] [ ] [ ]	Sex:
[ 4 ] [ ] [ ]	[ • ] Male [ ] Female
[ 5 ] [ ] [ ]	Range:
[ 6 ] [ ] [ ]	[ ] Range 1 [ ] Range 2 [ ] Range 3 [ ]

**Application - Others**

Standard: [ 1 ] [ 2 ] [ 3 ] [ 4 ] [ 5 ] [ 6 ]
Calib. Code: [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ]
Concentration
(% of Cal value): [ 000 ] [ 16.6% ] [ 38.5% ] [ 71.4% ] [ 125% ] [ 250% ]
Rack No. Position: [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ]
Sample Volume: [ 8 ] [ 5 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ]
Diluted S. Volume: [ 0 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ]
Diluent Volume: [ 0 ] [ 145 ] [ 240 ] [ 120 ] [ 60 ] [ 20 ]

**Special Wash – Edit Cell**

Test	Type	R1	Volume	Type	R2	Volume
[ Kappa ]	[ D1 ]		[ 270 ]	[ D1 ]		[ 270 ]

\* Open channels on the Modular P will not use an onboard Roche Saline as a diluent. An additional bottle of saline must be manually registered to the test channel (e.g. FKAP) as a 'DIL' reagent. Remove the label from a Roche Saline bottle and replace with an open channel bottle label. The saline will need to be manually assigned to the test channel with a 'DIL' reagent type and positioned in the outer ring of the reagent carousel e.g. position 1-8. ONLY after manual registration should you place the diluent and other reagents on board the instrument, then perform a Reagent Level Registration. This new diluent may be used for another open channel assay by using the same Diluent Bottle Code (311-400 or 901-910) on the appropriate Utility-Application-Analyze page of the parameters.

**NB: Users must enter the Technical Limit of each new kit as specified on the accompanying batch-specific Product Data Sheet, SIN060.DS.**

**NB: Users should only use exact volumes of standard and control materials as detailed below:**

- Use 500µL of the Kappa Free standard per calibration in a sample cup.
- Use 100µL of the Kappa Free control per test in a sample cup.
- Use 100µL of the Kappa Free High Control per test in a sample cup.

**8.4.5 Measuring range**

All samples must be first assayed at the standard 1/5 sample dilution, giving an approximate measuring range of 3.7-56.2mg/L. This enables a sensitivity of 0.8mg/L on neat serum samples. The upper limit of the measuring range using a sample dilution of 1/50 is 562mg/L. For samples measuring over this limit the following series of manual pre-dilutions should be used to minimize test usage.

Overall dilution	Analysers dilution	Manual pre-dilution	Approximate range (mg/L)
1/1	1/1	-	0.8 – 11.2
1/5	1/5	-	3.7 – 56.2
1/50	1/50	-	37 – 562
1/500	1/5	1/100*	370 – 5620
1/5000	1/50	1/100*	3700 – 56200

\*Make a manual pre-dilution of 1/100 by taking 100µL of sample and add 900µL system sample diluent to achieve an initial 1/10 dilution. From this, take 100µL of this dilution and add 900µL system sample diluent to achieve a final 1/100 dilution. Present the 1/100 diluted sample for analysis. Multiply the result x 100.

**9 QUALITY CONTROL**

The controls provided should be included in all assay runs. The kappa free concentration is stated on the accompanying Product Data sheet (SIN060.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 and the assay parameters 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.
- 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:** A small proportion of patient samples containing high concentrations of free kappa or free lambda can give a falsely low result for the "involved" light chain due to antigen excess. The amino acid composition of the light chain produced by an individual B cell clone will influence the level at which a sample may show antigen excess with the **Freelite** assay. In almost every case the concentration of the involved light chain will still be above the quoted normal range (3.30-19.40mg/L for free kappa and 5.71-26.30mg/L for free lambda) and/or the opposite light chain concentration will be below the quoted range and/or the free kappa/free lambda ratio will be outside the quoted range (0.26-1.65). Samples should be tested at both the initial dilution and with a 1/100 manual predilution (see section 8.4.5) in order to detect antigen excess if any of the following conditions are met:
  - a) sample shows either a free light chain concentration or a free kappa/free lambda ratio outside of the quoted range,
  - b) sample is from a patient that has previously demonstrated antigen excess, or
  - c) sample result does not agree with other clinical or laboratory findings.
- 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. Suspected samples should first be tested for antigen excess (see section 10.3 above) then further investigation by 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 prevented by always assaying the samples in the sequence 1/5, 1/50, 1/500, 1/5000 (see Section 8.4.5). Omitting a dilution step or using alternative dilutions must 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 Customers should be aware that use of the NaOHD solution as both a special wash and regular washing fluid is essential in order to prevent cuvette fogging.

## 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

262 normal subjects aged from 20 to 90 years were assayed using the 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 Hitachi assays we have assayed on 100 normal samples from normal UK donors aged from 20 to 60 years and 54 disease state sera with both the BNII and Hitachi **Freelite** assays. The results of regression analysis are as follows: for the kappa assay,  $y=0.94x + 2.85$ ,  $r=0.96$ , and for the lambda assay  $y=0.99x + 0.46$ ,  $r=0.99$  ( $y$  = Hitachi value,  $x$  = BNII value). This demonstrates that the more extensive data generated at the Mayo Clinic is applicable to the Hitachi assays.

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

### 11.2 Normal urine results

Urinary free light chain concentrations were measured from samples provided by 58 healthy adult donors. For both free kappa and free lambda measurements a number of samples ran below the measuring range of the assay. A total available range has been quoted.

Normal adult urine	Samples below detection limit (%)	Total range (mg/L)
Free Kappa	10	<0.78 - 13.48
Free Lambda	62	<2.22 - 5.9

## 12 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 12.1 Within-run precision

Three serum preparations containing different levels of free kappa were assayed. Each value given was calculated from 10 measurements made on the same assay run. All concentrations are in mg/L.

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean	8.2	30.0	48.9
CV%	8.02	3.71	2.95

### 12.2 Between-run precision

Three serum preparations containing different levels of free kappa were assayed on 10 separate assay runs using kits from a single batch. All concentrations are in mg/L.

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean	6.7	18.2	35.3
CV%	7.32	4.11	5.74

### 12.3 Linearity

The linearity of this assay has been confirmed using a serially diluted serum sample, which gave a regression plot of  $y = 1.01x - 0.02$  (mg/L),  $r = 1.00$ . ( $y$  = measured free kappa concentration,  $x$  = theoretical concentration).

### 12.4 Interference

Minimal assay interference by 200mg/L bilirubin (-0.82%), 5g/L haemoglobin (6.2%) and 2.5% chyle (5.8%) has been demonstrated using a 25mg/L free kappa control serum.

### 12.5 Comparison

**Sera:** 54 sera (10 normal, 44 from known multiple myeloma or amyloid patients) were assayed by the **Freelite** BNII kappa and lambda kits and on three commercially available immunofixation electrophoresis (IFE) kits. The clinical samples were assayed at a major independent reference centre in the USA.

	Freelite results			Summary	IFE results
	Free kappa	Free lambda	Free κ/λ ratio		
Normal sera (10)	10 normal	10 normal	9 normal 1 borderline high	10 normal	10 normal
Myeloma/amyloid sera (24)	24 high	12 normal 12 low	24 high	24 monoclonal kappa	19-24* show monoclonal band
Myeloma/amyloid sera (20)	10 normal 10 low	15 high 5 normal	20 low	20 monoclonal lambda	12-14* show monoclonal band

\*Method dependent

All abnormal serum light chain concentrations were detected by the **Freelite** assays, whereas some were missed by the less sensitive IFE methods.

**Urines:** 28 urines (9 normal, 19 from known/suspected myeloma patients) were assayed by the **Freelite** kappa and lambda kits and on a commercially available immunofixation electrophoresis (IFE) method.

	Freelite results			Summary	IFE results
	Free kappa	Free lambda	Free κ/λ ratio		
Normal urine (9)	7 normal 2 borderline high	4 normal 5 borderline high	8 normal 1 borderline high	9 normal	9 normal
Kappa myeloma urine (9)	9 high	4 high 5 borderline high	8 high 1 normal	9 monoclonal kappa	9 show monoclonal band(s)
Lambda myeloma urine(10)	7 high 3 normal	10 high	10 low	10 monoclonal lambda	10 show monoclonal band

All abnormal urine light chain concentrations were detected by both the **Freelite** and IFE assays.

## 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® Freie Leichtkette Kappa (Human) Kit zur Verwendung auf dem HITACHI 911/912/917/Modular P

### Zur *in-vitro* Diagnostik

Bestell-Nr.: LK016.H

In England hergestellt von:

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

Vertrieb in Deutschland, Österreich und der Schweiz 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.



#### 1 VERWENDUNGSZWECK

Dieser Kit dient zur quantitativen Bestimmung der Freien Leichtkette ‚Kappa‘ im Serum und Urin unter Verwendung des Hitachi 911, Hitachi 912, Hitachi 917 und Modular P von Roche. Die quantitative Bestimmung der Freien Leichtketten unterstützt die Diagnose und die Verlaufskontrolle bei Multiplen 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  $\mu$ ), durch die Immunglobulinklasse definiert wird, und zwei identischen Leichtketten ( $\kappa$  oder  $\lambda$ ) zusammen. Jede Leichtkette ist kovalent an eine schwere Kette gebunden und die zwei schweren Ketten sind in der Gelenks-Region 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 beiden Leichtketten 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. Die FLC-Konzentrationen sind im Urin niedrig. In einer gesunden Niere werden sie über die Tubuluszellen selektiv resorbiert, so dass ihr Vorkommen im Urin deshalb auf eine Sekretion in den Harntrakt zurückzuführen ist.

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 Autoimmunerkrankungen wie SLE auftreten. Das Auftreten von höheren Konzentrationen an freien Leichtketten im Urin kann auf eine Nierenerkrankung oder eine maligne lymphoproliferative Erkrankung, wie z. B. Multiples Myelom, hinweisen. Die mit dem Urin ausgeschiedenen monoklonalen freien Leichtketten werden als Bence Jones-Proteine bezeichnet<sup>(1-13)</sup>.

#### 3 PRINZIP

Die turbidimetrische Bestimmung der Konzentration von löslichen Antigenen beruht auf der Reaktion zwischen einem Antigen und einem spezifischen Antiserum in einem Reaktionsgefäß oder Küvette, wodurch unlösliche Immunkomplexe gebildet werden. Wird Licht durch die Küvette gestrahlt, wird das Licht mit zunehmender Konzentration an Immunkomplexen gestreut. Die Lichtstreuung wird bestimmt, indem die Intensitätsabnahme des einfallenden Lichtstrahls gemessen wird. Da der Antikörper sich im Überschuss in der Küvette befindet, ist die Menge an Immunkomplexen direkt proportional zur Antigenkonzentration. Eine Reihe von Kalibratoren mit bekannter Antigenkonzentration werden gemessen und anhand der Messsignale wird eine Kalibrationskurve berechnet. Die Antigenkonzentration von unbekanntem Proben wird automatisch nach der Messung direkt an Hand der im Gerät gespeicherten Kalibrationskurve berechnet.

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

#### 4 REAGENZIEN

**4.1 Latexreagenz:** Besteht aus monospezifischen polyklonalen Antikörpern, der an Polystyren-Latexpartikel gekoppelt wurden. Enthaltene Konservierungsmittel: 0,05% ProClin™, 0,1% E-aminocaprinsäure (EACA) und 0,01% Benzamidin.

**4.2 Kalibrator und Kontrollen:** Sie werden aus normalem Humanserum hergestellt, enthalten Freie Leichtkette Kappa 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 Abschluss 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.



\*Die offenen Kanäle des Hitachi 917 können so programmiert werden, dass Kochsalzlösung (NaCl) von Roche als Proben-Diluens verwendet wird. Die Diluens-Parameter auf der Seite ‚Wartung/Util – Applikation – Analyse‘ bei den jeweiligen Tests eingeben. Code ‚00951‘ als Reagenzcode eingeben – dies entspricht dem Code für NaCl von Roche.

#### Applikation – Kalibration

Kalibrationstyp: [ Logit-Log (4p) ] Auto-Kalibration  
 Punkt: [ 6 ] Zeit-Kalibration  
 Span Punkt: [ 6 ] [ ] Leerwert [ ]  
 Wichtung: [ 0 ] [ ] Span [ ]  
 [ ] 2 Punkt [ ]  
 [ ] Volt [ ]  
 S-Grenze: [ 999.9 ] Wechsel-Kalibration  
 Abw.-Grenze: [ 99 ] % [ 32000 ] Abs Modul [ ]  
 Empfindl.-Grenze: [ -99999 ] - [ 99999 ] Charge [ ]  
 S1. Extinktionsgrenze: [ -32000 ] - [ 32000 ] Flasche [ ]

#### Applikation – Bereich

Applikationscode: [ \*\*\* ] NormalBereich  
 Einheit: [ mg/L ] Männlich  
 Befund Name: [ Kappa Free ] [ 100 ] [ Jahre ] [ -99999 ] [ 99999 ]  
 Daten Modus: [ Activ ] [ 100 ] [ Jahre ] [ -99999 ] [ 99999 ]  
 Techn. Grenze: [ STD2 CONC ] [ STD6 CONC ] [ -99999 ] [ 99999 ]  
 Wiederh. Grenze: [ -99999 ] - [ 99999 ] Welblich  
 [ ] Kontroll Intervall/Zeit [ ] [ 100 ] [ Jahre ] [ -99999 ] [ 99999 ]  
 [ ] Qualitatives Ergebnis [ ] [ 100 ] [ Jahre ] [ -99999 ] [ 99999 ]  
 [ 1 ] [ ] [ ] [ ]  
 [ 2 ] [ ] [ ] [ ]  
 [ 3 ] [ ] [ ] [ ]  
 [ 4 ] [ ] [ ] [ ]  
 [ 5 ] [ ] [ ] [ ]  
 [ 6 ] [ ] [ ] [ ]  
 Ersatz  
 Geschlecht:  
 [ • ] Männlich [ ] Welblich  
 Bereich:  
 [ ] Ber. 1 [ ] Ber. 2 [ ] Ber. 3 [ ]

#### Applikation – Standards

Standard: [ 1 ] [ 2 ] [ 3 ] [ 4 ] [ 5 ] [ 6 ]  
 Kalib. Code: [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ]  
 Konzentration  
 (% of Kal Konz.): [ 000 ] [ 16.6% ] [ 38.5% ] [ 71.4% ] [ 125% ] [ 250% ]  
 Rack Nr. Pos: [ \*\* ] [ \*\* ] [ \*\* ] [ \*\* ] [ \*\* ] [ \*\* ]  
 Probe Volumen: [ 8 ] [ 5 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ]  
 Verd. P. Volumen: [ 0 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ]  
 Diluent Volumen: [ 0 ] [ 145 ] [ 240 ] [ 120 ] [ 60 ] [ 20 ]

#### Special Wash – Edit Cell

Test Flaschen Code R1 Volumen Flaschen Code R2 Volume  
 [ Kappa ] [ D1 ] [ 270 ] [ D1 ] [ 270 ]

#### 8.4.4 Testparameter (Modular P)

##### Applikation – Analyse

Select Test: [ Kappa ]  
 Art/Zeit/Twin [ 2 point end ] [ ] [ 10 ] [ 7 ] [ 34 ] [ 0 ] [ 0 ]  
 Wellenlänge (Neben/Haupt): [ ] [ 600 ] [ ]

##### Probe-Volumen

Normal: [ 20 ] [ 8 ] [ 80 ] R1: [ 150 ] [ 0 ] [ \*\*\*\*\* ] [ 0 ] Zeltpkt  
 Reduziert: [ 3 ] [ 8 ] [ 147 ] R2: [ 90 ] [ 0 ] [ \*\*\*\*\* ] [ 0 ] [ ]  
 Erhöht: [ 8 ] [ 0 ] [ 0 ] R3: [ 0 ] [ 0 ] [ \*\*\*\*\* ] [ 0 ] [ ]  
 R4: [ 0 ] [ 0 ] [ \*\*\*\*\* ] [ 0 ] [ ]

##### Diluent

[ ] Wasser  
 [ • ] Diluent [ 311 ]\*

Extinktionsgrenze: [ 32000 ] [ Steigend ]  
 Prozonengrenze: [ 32000 ] [ 0 ] [ 0 ] [ 0 ] [ 0 ] [ Uber ]  
 Küvetten detergent: [ Detergenz 1 ]  
 Twin Test: [ ]

##### Applikation – Kalibration

Kalibrationstyp: [ Logit-Log (4p) ] Auto-Kalibration  
 Punkt: [ 6 ] Zeit-Kalibration  
 Span Punkt: [ 6 ] [ ] Leerwert [ ]  
 Wichtung: [ 0 ] [ ] Span [ ]  
 [ ] 2 Punkt [ ]  
 [ ] Volt [ ]  
 S-Grenze: [ 999.9 ] Wechsel-Kalibration  
 Abw.-Grenze: [ 99 ] % [ 32000 ] Abs Modul [ ]  
 Empfindl.-Grenze: [ -99999 ] - [ 99999 ] Charge [ ]  
 S1. Extinktionsgrenze: [ -32000 ] - [ 32000 ] Flasche [ ]

##### Applikation – Bereich

Applikationscode: [ \*\*\* ] NormalBereich  
 Einheit: [ mg/L ] Männlich  
 Befund Name: [ Kappa Free ] [ 100 ] [ Jahre ] [ -99999 ] [ 99999 ]  
 Daten Modus: [ Activ ] [ 100 ] [ Jahre ] [ -99999 ] [ 99999 ]  
 Techn. Grenze: [ STD2 CONC ] [ STD6 CONC ] [ -99999 ] [ 99999 ]  
 Wiederh. Grenze: [ -99999 ] - [ 99999 ] Welblich  
 [ ] Kontroll Intervall/Zeit [ ] [ 100 ] [ Jahre ] [ -99999 ] [ 99999 ]  
 [ ] Qualitatives Ergebnis [ ] [ 100 ] [ Jahre ] [ -99999 ] [ 99999 ]  
 [ 1 ] [ ] [ ] [ ]  
 [ 2 ] [ ] [ ] [ ]  
 [ 3 ] [ ] [ ] [ ]  
 [ 4 ] [ ] [ ] [ ]  
 [ 5 ] [ ] [ ] [ ]  
 [ 6 ] [ ] [ ] [ ]  
 Ersatz  
 Geschlecht:  
 [ • ] Männlich [ ] Welblich  
 Bereich:  
 [ ] Ber. 1 [ ] Ber. 2 [ ] Ber. 3 [ ]

##### Applikation – Standards

Standard: [ 1 ] [ 2 ] [ 3 ] [ 4 ] [ 5 ] [ 6 ]  
 Kalib. Code: [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ] [ \*\*\* ]  
 Konzentration  
 (% of Kal Konz.): [ 000 ] [ 16.6% ] [ 38.5% ] [ 71.4% ] [ 125% ] [ 250% ]  
 Rack Nr. Pos: [ \*\* ] [ \*\* ] [ \*\* ] [ \*\* ] [ \*\* ] [ \*\* ]  
 Probe Volumen: [ 8 ] [ 5 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ]  
 Verd. P. Volumen: [ 0 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ]  
 Diluent Volumen: [ 0 ] [ 145 ] [ 240 ] [ 120 ] [ 60 ] [ 20 ]

#### Special Wash – Edit Cell

Test R1 R2  
 Flaschen Code Volumen Flaschen Code Volume  
 [ Kappa ] [ D1 ] [ 270 ] [ D1 ] [ 270 ]

\* Bei Verwendung der freiprogrammierbaren Kanäle auf dem Modular P wird die normale, in dem Gerät befindliche Roche physiologische Kochsalzlösung nicht als Diluens verwendet. Aus diesem Grund muss ein zusätzliches Gefäß mit Kochsalzlösung manuell für diesen Testkanal (z. B. FKAP) als ‚DIL‘-Reagenz eingerichtet werden. Das Etikett von dem Gefäß mit der Roche-Kochsalzlösung entfernen und durch ein Etikett für Verwendung eines freiprogrammierbaren Kanals ersetzen. Die Kochsalzlösung dann manuell mit einem Testkanal verknüpfen. Die Kochsalzlösung hierzu als Reagenztyp ‚DIL‘ definieren und auf dem äußeren Ring des Reagenzienkarussells (z. B. Position 1-8) platzieren. Das Diluens und die anderen Reagenzien NUR nach der manuellen Registrierung im Gerät platzieren. Anschließend eine Überprüfung des Reagenzien Levels durchführen. Das neu definierte Diluens kann auch für andere Tests auf freiprogrammierbaren Kanälen verwendet werden, in dem der gleiche Flaschencode (z. B. 311-400 oder 901-910) in den entsprechenden Testparameter auf der Seite ‚Utility-Application-Analyse‘ verwendet wird.

#### Wichtiger Hinweis:

Die technischen Grenzen müssen für jede neue Kit-Charge vom Anwender eingegeben werden, wie auf dem beiliegenden chargenspezifischen Kalibrator/Kontrolldatenblatt (Product Data Sheet, SIN060.DS) angegeben.

#### Wichtiger Hinweis:

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

- 500µL Freies Kappa Standard pro Kalibration in einem Probengefäß.
- 100µL Freies Kappa Kontrolle pro Test in einem Probengefäß.
- 100µL Freies Kappa Kontrolle „high“ pro Test in einem Probengefäß.

#### 8.4.5 Messbereich

Alle Proben müssen zuerst in der Standardprobenverdünnung von 1/5 gemessen werden, mit einem Messbereich von 3,7-56,2mg/L. Daraus resultiert eine Sensitivität von 0,8mg/L für unverdünnte Serumproben. Die obere Grenze des Messbereichs liegt bei 562mg/L bei Verwendung einer 1/50-Verdünnung. Für Proben, deren FLC-Konzentration bei einer 1/50-Verdünnung oberhalb der Kalibrationskurve liegen, wird empfohlen folgende serielle Verdünnungen manuell herzustellen um die Anzahl der Tests zu minimieren:

Gesamt-Verdünnung	Verdünnung des Geräts	Manuelle Verdünnung	Ungefäher Messbereich (mg/L)
1/1	1/1	-	0,8 – 11,2
1/5	1/5	-	3,7 – 56,2
1/50	1/50	-	37 – 562
1/500	1/5	1/100*	370 – 5620
1/5000	1/50	1/100*	3700 – 56200

\* Hierzu eine 1/10-Verdünnung manuell herstellen (100µL Probe + 900µL System-Probediluens) Von dieser Probenverdünnung eine weitere 1/10-Verdünnung herstellen, um eine 1/100-Endverdünnung zu erhalten. Diese Probe (1/100-verdünnt) messen und das Ergebnis mit dem Faktor 100 multiplizieren.

#### 9 QUALITÄTSKONTROLLE

Die im Kit enthaltenen Kontrollen sollten in jedem Testansatz mitgeführt werden. Die Konzentration der Freien Leichtkette Kappa ist auf dem im Kit mitgelieferten Kalibrator/Kontrolldatenblatt (Product Data Sheet, SIN060.DS) angegeben. Ergebnisse sollten nur akzeptiert werden, wenn die Kontrollen nicht mehr als ±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 sollten das Gerät und die programmierten Testparameter überprüft werden. Lässt sich das Problem nicht lösen, wenden Sie sich bitte an Ihre Lieferfirma.

#### 10 GRENZEN DES TESTS

- 10.1 Turbidimetrische Methoden sind nicht für die Bestimmung von stark lipämischen oder hämolytierten Proben, oder Proben, die hohe Konzentrationen an zirkulierenden Immunkomplexen (CIC) enthalten, geeignet, da diese Proben einen nicht vorhersagbaren Anteil an unspezifischem Streulicht erzeugen können. Ungewöhnliche Ergebnisse sollten mit einer alternativen Methode überprüft werden.
- 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:** Ein sehr geringer Anteil der Patientenproben, die eine hohe Konzentration an Freiem Kappa oder Freiem Lambda enthalten, können aufgrund des Vorliegens einer Antigenüberschussituation falsch-niedrige Ergebnisse für die ‚erhöhte‘ Leichtkette erzeugen. Die Konzentration, bei der eine Probe eine Antigenüberschuss-Reaktion in dem **Freelite** Test zeigen kann, ist von der Aminosäurezusammensetzung der Leichtkette, die von einem individuellen B-Zell-Klon produziert wird, abhängig. In fast allen Fällen wird die Konzentration der erhöhten Freien Leichtkette immer noch oberhalb des angegebenen Normalbereichs liegen (3,30-19,40mg/L für Freies Kappa und 5,71-26,30mg/L für Freies Lambda) und/oder die andere Freie Leichtketten-Konzentration wird unterhalb des angegebenen Bereichs liegen und/oder das Verhältnis Freies Kappa zu Freiem Lambda (κ-λ-Ratio) wird außerhalb des geltenden Normalbereichs (0,26-1,65) liegen. Daher sollte jede Probe sowohl in der Standardverdünnung als auch in einer manuell hergestellten 1/100-Vorverdünnung (siehe Abschnitt 8.4.5) erneut getestet werden, um einen Antigenüberschuss zu erfassen, wenn eine der folgenden Bedingungen zutrifft:

- a) Die Probe weist eine Konzentration an Freien Leichtketten oder eine κ-λ-Ratio auf, die außerhalb der angegebenen Normalbereiche liegt.
- b) Die Probe stammt von einem Patienten, bei dem bereits früher ein Antigenüberschuss gefunden wurde.

oder

- c) Die Probenergebnisse stimmen nicht mit dem klinischen Bild oder anderen Laborbefunden überein.

- 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. Fragliche Proben sollten zunächst auf Vorliegen eines Antigenüberschusses (siehe Abschnitt 10.3) überprüft werden und mit anderen Labormethoden (wie z. B. Immunfixation oder Serumweißelektrophorese) 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 1/5, 1/50, 1/500, 1/5000 verdünnt werden (siehe Abschnitt 8.4.5). 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 Bitte beachten Sie, dass die Verwendung von NaOHD-Lösung sowohl als Spezialwaschlösung, als auch als reguläre Waschflüssigkeit essentiell ist, um eine Trübung der Küvetten zu vermeiden.

## 11 ERWARTETE WERTE

Die unten aufgeführten Normalbereiche basieren auf der Untersuchung eines normalen Spenderkollektivs und dienen nur zur Orientierung. Es wird dringend empfohlen, dass wenn möglich lokale Normbereiche bestimmt werden sollten.

### 11.1 Erwachsene – Normalbereiche im Serum

282 normalen Individuen im Alter zwischen 20 und 90 Jahren wurden mit den Binding Site **Freelite** BN™II \* Kits gemessen<sup>(11)</sup>. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Normale Erwachsene: Serum	Mittlere Konz.	Median Konz.	95 Perzentile Bereich
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)
	Mittelwert	Median	Gesamtbereich
Kappa/Lambda Verhältnis	0,63	0,60	0,26 - 1,65

In einer Vergleichsstudie zwischen den **Freelite** BNII und Hitachi Kits wurde gezeigt, dass die Normalbereiche der beiden Methoden vergleichbar sind. Dazu wurden 100 Seren von normalen britischen Blutspendern im Alter zwischen 20 und 60 Jahren und 54 pathologische Seren mit beiden Tests parallel bestimmt. Bei der Regressionsanalyse wurden folgende Ergebnisse erhalten: **Freelite** Kappa:  $y=0,94x + 2,85$ ,  $r = 0,96$  und für **Freelite** Lambda:  $y=0,99x + 0,46$ ,  $r = 0,99$  ( $y$ = Hitachi-Werte,  $x$ = BNII-Werte). Diese Daten zeigen, dass die in der Mayo-Klinik ermittelten Daten auf den **Freelite** Hitachi-Kit übertragbar sind.

\*BN™II ist ein Warenzeichen von Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.

### 11.2 Erwachsene - Normalbereiche im Urin

Die Konzentration der Freien Leichtketten wurde im Urin von 58 gesunden Erwachsenen gemessen. Sowohl bei Freiem Kappa als auch bei Freiem Lambda waren einige Konzentrationen unterhalb des Messbereichs dieser Kits. Aus diesen Daten wurden folgende Konzentrationsbereiche ermittelt:

Normaler Urin von Erwachsenen	Anzahl der Proben unterhalb der Nachweisgrenze (%)	Gesamtkonzentrationsbereich (mg/L)
Freies Kappa	10	<0,78 - 13,48
Freies Lambda	62	<2,22 - 5,9

## 12 LEISTUNGSDATEN

### 12.1 Intra-Assay-Variation

Drei verschiedene Serumpräparationen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Freier Leichtkette Kappa wurden gemessen. Jeder angegebene Wert wurde aus 10 Messungen, die im gleichen Testansatz durchgeführt wurden, berechnet. Alle Konzentrationsangaben sind in mg/L.

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mittelwert	8,2	30,0	48,9
VK%	8,02	3,71	2,95

### 12.2 Inter-Assay-Variation

Drei verschiedene Serumpräparationen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Freier Leichtkette Kappa wurden mit Kits einer Charge in zehn verschiedenen Testansätzen gemessen. Alle Konzentrationsangaben sind in mg/L.

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mittelwert	6,7	18,2	35,3
VK%	7,32	4,11	5,74

### 12.3 Linearität

Die Linearität des Tests wurde durch Messen einer seriellen Verdünnungsreihe eines Serums bestätigt: Regressionsanalyse:  $y = 1,01x - 0,02$  (mg/L),  $r = 1,00$ . ( $y$  = gemessene Konzentration an freiem Kappa,  $x$  = theoretische Konzentration).

### 12.4 Interferierende Substanzen

Beim Messen einer Kontrolle mit einer Konzentration von 25mg/L Freies Kappa wurden geringfügige Interferenzen bei 200mg/L Bilirubin (-0,82%), 5g/L Hämoglobin (6,2%) und 2,5% Chylus (5,8%) gefunden.

### 12.5 Vergleichsuntersuchungen

**Serum:** 54 Seren (10 Normale, 44 von bekannten Patienten mit Multiplem Myelom oder Amyloidose) wurden mit den **Freelite** BNII Kappa und Lambda Kits und drei kommerziell erhältlichen Immunfixations Elektrophorese (IFE) Kits untersucht. Die klinischen Proben (44) wurden an einem unabhängigen Referenzzentrum in den USA gemessen.

	Freelite Ergebnisse				IFE Ergebnisse
	Freies Kappa	Freies Lambda	Freies κ/λ Verhältnis	Zusammenfassung	
Normale Seren (10)	10 normal	10 normal	9 normal 1 grenzwertig hoch	10 normal	10 normal
Myeloma/ Amyloid Seren (24)	24 hoch	12 normal 12 niedrig	24 hoch	24 monoklonal kappa	19-24* zeigen monoklonale Banden
Myeloma/ Amyloid Seren (20)	10 normal 10 niedrig	15 hoch 5 normal	20 niedrig	20 monoklonal lambda	12-14* zeigen monoklonale Banden

\*Methoden-abhängig.

Alle abnormalen Serum-Leichtketten-Konzentrationen wurden mit den **Freelite**-Kits erfasst, während in den weniger sensitiven IFE-Methoden einige übersehen wurden.

**Urine:** 28 Urine (9 Normale, 19 von bekannten/vermuteten Myelom-Patienten) wurden mit den **Freelite** Kappa und Lambda Kits und einer kommerziell erhältlichen Immunfixation Elektrophorese (IFE) Methode untersucht.

	Freelite Ergebnisse				IFE Ergebnisse
	Freies Kappa	Freies Lambda	Freies κ/λ Verhältnis	Zusammenfassung	
Normale Urine (9)	7 normal 2 grenzwertig hoch	4 normal 5 grenzwertig hoch	8 normal 1 grenzwertig hoch	9 normal	9 normal
Kappa Myelom Urine (9)	9 hoch	4 hoch 5 grenzwertig hoch	8 hoch 1 normal	9 monoklonal kappa	9 zeigen monokl. Banden
Lambda Myelom Urine(10)	7 hoch 3 normal	10 hoch	10 niedrig	10 monoklonal lambda	10 zeigen monokl. Banden

Alle abnormalen Leichtketten-Konzentrationen wurden mit den **Freelite**-Kits und der IFE erfasst.

## 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	Prelevement et préparation des échantillons
8	Méthodologie
9	Control de qualite
10	Limites
11	Valeurs attendues
12	Performances
13	Bibliographie

## Coffret kappa libre humaine Freelite® pour utilisation sur HITACHI 911/912/917/Modular P

Pour un usage en diagnostic *in-vitro*

Code Produit: LK016.H

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, CS 30026, 38522 Saint Egrève Cedex  
Téléphone : 04.38.02.19.19  
Fax : 04.38.02.19.20  
E-mail : info@bindingsite.fr

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



### 1 INDICATIONS

Ce coffret permet de quantifier les chaînes libres kappa dans le sérum et les urines sur les Hitachi 911, Hitachi 912, Hitachi 917 et Modular P 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 amylose AL, 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 aux 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  $\kappa$  est sous forme de monomère de façon prédominante alors que la chaîne libre  $\lambda$  est sous forme dimérique d'environ 45kD. Ceci induit un taux de filtration glomérulaire différentiel pour les chaînes légères libres  $\kappa$  et  $\lambda$  et peut expliquer le taux sérique  $\kappa$  libre/ $\lambda$  libre observé de 0,625 comparé au taux de chaînes légères liées  $\kappa/\lambda$  de 2,0.

Le taux urinaire des ChLL est plus faible que le taux sérique car les cellules tubulaires des reins normaux absorbent sélectivement les ChLL et donc leur présence dans l'urine est probablement liée à une sécrétion dans les voies urinaires.

Des taux sériques élevés de chaînes légères libres sont associés à une prolifération maligne de plasmocytes (ex. myélomes multiples), une 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. L'apparition de taux urinaires élevés en chaînes légères peut indiquer une maladie rénale ou une maladie lymphoproliférative maligne comme les myélomes multiples. Les chaînes légères monoclonales dans les urines associées à une malignité lymphoïde sont appelées protéines de Bence Jones <sup>(1-13)</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 mesurée par la diminution de l'intensité lumineuse de la lumière incidente. 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 de la lumière diffusée relative à la réaction antigène-anticorps.

### 4 REACTIFS

- 4.1 **Réactif latex** : Latex de polystyrène recouvert d'anticorps polyclonaux monospécifiques. Conservateurs : 0,05% ProClin™, 0,1% E-amino-n-caproic acid (EACA), 0,01% benzamidine.
- 4.2 **Calibrateurs et contrôles** : Sérums humains contenant des ChLL kappa. Fourni sous forme liquide. Conservateurs : 0,099% d'azide de sodium, 0,1% EACA, 0,01% benzamidine.
- 4.3 **Réactif supplémentaire** : Contient 0,099% d'azide de sodium comme conservateur.

\*ProClin™ est une marque déposée par Rohm and Haas Corp., Philadelphia, 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 l'étiquette du coffret. NE PAS CONGELER. Le réactif latex, le calibrateur et le contrôle peuvent être stockés à 2-8°C 3 mois après ouverture en prenant les précautions nécessaires afin d'éviter une évaporation et une contamination.

### 7 PRELEVEMENT ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Utiliser des échantillons de sérums ou d'urines frais ou congelés. Le sérum doit être obtenu par ponction veineuse. Laisser coaguler et séparer le sérum dès que possible afin d'éviter l'hémolyse. Les échantillons peuvent être stockés à 2-8°C pendant 21 jours. Pour un stockage prolongé, ils doivent être gardés à -20°C ou à une température inférieure. Des congélations et des congélations répétées doivent être évitées. Les échantillons de sérums ou d'urines contaminés par des bactéries, lipidiques, hémolysés ou contenant des particules de matière 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 être testés en utilisant le coffret lambda libre **Freelite** Binding Site (LK018.H).

#### 8.1 Matériel fourni

- 8.1.1 2 x 6,5mL *Human Kappa Free Reagent (R2)* (réactif libre kappa, R2)
8.1.2 1 x 25mL *Human Kappa Free Supplementary Reagent (R1)* (réactif supplémentaire libre kappa, R1)
8.1.3 2 x 1,5mL *Human Kappa Free Standard* (standard libre kappa)
8.1.4 1 x 1,0mL *Human Kappa Free Control Serum* (contrôle libre kappa)
8.1.5 1 x 1,0mL *Human Kappa Free High Control Serum* (contrôle haut libre kappa)

#### 8.2 Matériel nécessaire et non fourni

- 8.2.1 Matériel nécessaire au prélèvement et préparation des échantillons : tubes, centrifugeuse, etc.
8.2.2 Flacons de réactifs vides avec étiquettes code-barre (disponibles chez Roche)
8.2.3 Solution de lavage spéciale NaOHD, références 402 – 1822551 et 1551540 (disponibles chez Roche).
8.2.4 Un Hitachi 911, 912, 917 ou Modular P complètement équipé et opérationnel. Un disque bibliothèque Hitachi 911 avec les codes d'application 361-400.

#### 8.3 Préparation des réactifs

Avant le chargement des réactifs, les mélanger doucement par inversion en évitant la formation de bulles ou de mousse à la surface, ceci pouvant interférer avec l'aspiration du réactif.

#### 8.4 Procédure

L'utilisateur doit être familiarisé avec le maniment du Hitachi avant de lancer le test. L'appareil doit être préparé selon les recommandations du fabricant et le protocole doit être saisi de la façon suivante.

Les instructions d'utilisation complètes pour l'Hitachi 911, l'Hitachi 912, l'Hitachi 917 et Modular P sont disponibles ; veuillez contacter votre distributeur local pour de plus amples informations. Les instructions avec un astérisque indiquent qu'un paramètre est déterminé par l'utilisateur.

NB : Les tests Kappa Libre nécessitent l'installation d'un Calibrateur sain pour le Calibrateur 1 et d'un Calibrateur Kappa Humain pour les Calibrateurs 2-6. Installer ces calibrateurs en utilisant n'importe quel numéro de position non assignée entre 900 et 999. Si un calibrateur sain a déjà été installé sur l'automate, il peut être assigné au test Kappa Libre.

#### 8.4.1 Paramètres (Hitachi 911)

Table of test parameters for Hitachi 911 including Test Name, Data Mode, Control Interval, Expected Value, Technical Limit, and Calibration Type.

Table of Auto Time Out and Auto Change parameters including Blank, Span, 2 Point, Full, Lot, and Bottle settings.

Table of Special Wash Programming parameters including Cell Wash and Wavelength settings.

#### 8.4.2 Paramètres (Hitachi 912)

##### Application - Analyse

Table for Application - Analyse parameters including Select Test, Test Name, App Code, and Wavelength settings.

Table for Sample Volume and Reagent parameters, showing Class 1 and Class 2 settings for Normal, Decrease, Increase, and Reagent R1-R4.

Table for Age Limit and Prozone Limit parameters, including Class 1, Class 2, Dec/In, and Twin Test settings.

##### Application - Calibration

Table for Application - Calibration parameters including Select Test, Calibration Type, Point, Weight, and Span Point.

##### Auto-Calibration

Table for Auto-Calibration parameters including Time Out, Change Over, Lot, Bottle, 3D Limit, Duplicate Limit, Sensitivity Range, and St. Abs. Range.

##### Application - Gamme

Table for Application - Gamme parameters including Select Test, Report Name, Control Interval, Instrument Factor, App Code, and Sample Type.

##### Expected Range

Table for Expected Range showing Age, Male, Female, and Use Qualitative Tables for various test ranges.

Table for Default Age and Default Sex parameters including Repeat Range.

Table for Class 1 and Class 2 Technical Range parameters.

##### Application - Autres

Table for Application - Autres parameters including Standard, Calibration Code, Concentration, and Diluted Volume.

##### Lavage spécial - Edit Cell

Table for Lavage spécial - Edit Cell parameters including Test, R1, R2, Bottle Code, and Volume.

#### 8.4.3 Paramètres (Hitachi 917)

##### Application - Analyse

Table for Application - Analyse parameters including Select Test, Assay/Time/Point, and Wavelength settings.

##### Sample Volume

Table for Sample Volume and Reagent parameters, showing Normal, Decrease, Increase, and Reagent R1-R4 settings.

##### Diluent

Table for Diluent parameters including Water and Diluent settings.

Table for Abs Limit, Prozone Limit, Cell Detergent, and Twin Test parameters.

\*Les canaux ouverts sur l'automate Roche Hitachi 917 peuvent être programmés pour utiliser la solution saline Roche comme diluant échantillon. Le paramètre « Diluent », trouvé à la page «Maint/Utility-Application-Analyse» de l'analyse concernée, doit être entré '00951', qui est la référence d'un flacon de solution saline Roche.

### Application - Calibration

Calibration Type: [ Logit-Log (4p) ]	<u>Auto-Calibration</u>
Point: [ 6 ]	Time Out
Span Point: [ 6 ]	[ ] Blank [ ]
Weight: [ 0 ]	[ ] Span [ ]
	[ ] 2 Point [ ]
	[ ] End [ ]
SD Limit: [ 999.9 ]	<u>Change Over</u>
Duplicate Limit: [ 99 ] % [ 32000 ] Abs	Module [ ]
Sensitivity Range: [ -99999 ] - [ 99999 ]	Lot [ ]
S1. Abs. Range: [ -32000 ] - [ 32000 ]	Bottle [ ]

### Application - Gamme

App Code: [ *** ]	<u>Expected Range</u>
Unit: [ mg/L ]	Male
Report Name: [ Kappa Free ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Data Mode: [ Active ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Technical Limit: [ STD2 CONC ] [ STD6 CONC ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
Repeat Limit: [ -99999 ] - [ 99999 ]	Female
[ ] Control Time Interval [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ ] Qualitative [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ 1 ] [ ] [ ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
[ 2 ] [ ] [ ]	
[ 3 ] [ ] [ ]	
[ 4 ] [ ] [ ]	Default Sex:
[ 5 ] [ ] [ ]	[ • ] Male [ ] Female
[ 6 ] [ ] [ ]	Range:
	[ ] Range 1 [ ] Range 2 [ ] Range 3 [ ]

### Application - Autres

Standard: [ 1 ] [ 2 ] [ 3 ] [ 4 ] [ 5 ] [ 6 ]
Calib. Code: [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ]
Concentration
(% of Cal value): [ 000 ] [ 16.6% ] [ 38.5% ] [ 71.4% ] [ 125% ] [ 250% ]
Rack No. Position: [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ]
Sample Volume: [ 8 ] [ 5 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ]
Diluted S. Volume: [ 0 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ]
Diluent Volume: [ 0 ] [ 145 ] [ 240 ] [ 120 ] [ 60 ] [ 20 ]

### Lavage spécial - Edit Cell

Test	Type	R1	Volume	Type	R2	Volume
[ Kappa ]	[ D1 ]		[ 270 ]	[ D1 ]		[ 270 ]

### 8.4.4 Paramètres (Modular P)

#### Application - Analyze

Select Test: [ Kappa ]	
Assay/Time/Point [ 2 point end ] [ ] [ 10 ] [ 7 ] [ 34 ] [ 0 ] [ 0 ]	
Wavelength (2 <sup>nd</sup> /Primary): [ ] [ 600 ]	
<u>Sample Volume</u>	<u>Reagent</u>
Normal: [ 20 ] [ 8 ] [ 80 ] R1: [ 150 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] Timing	
Decrease: [ 3 ] [ 8 ] [ 147 ] R2: [ 90 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] [ ]	
Increase: [ 8 ] [ 0 ] [ 0 ] R3: [ 0 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] [ ]	
	R4: [ 0 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] [ ]

#### Diluent

[ ] Water
[ • ] Diluent [ 311 ]*
Abs Limit: [ 32000 ] [ Increase ]
Prozone Limit: [ 32000 ] [ 0 ] [ 0 ] [ 0 ] [ 0 ] [ Upper ]
Cell Detergent: [ Detergent 1 ]
Twin Test: [ ]

### Application - Calibration

Calibration Type: [ Logit-Log (4p) ]	<u>Auto-Calibration</u>
Point: [ 6 ]	Time Out
Span Point: [ 6 ]	[ ] Blank [ ]
Weight: [ 0 ]	[ ] Span [ ]
	[ ] 2 Point [ ]
	[ ] End [ ]
SD Limit: [ 999.9 ]	<u>Change Over</u>
Duplicate Limit: [ 99 ] % [ 32000 ] Abs	Module [ ]
Sensitivity Range: [ -99999 ] - [ 99999 ]	Lot [ ]
S1. Abs. Range: [ -32000 ] - [ 32000 ]	Bottle [ ]

### Application - Gamme

App Code: [ *** ]	<u>Expected Range</u>
Unit: [ mg/L ]	Male
Report Name: [ Kappa Free ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Data Mode: [ Active ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Technical Limit: [ STD2 CONC ] [ STD6 CONC ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
Repeat Limit: [ -99999 ] - [ 99999 ]	Female
[ ] Control Time Interval [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ ] Qualitative [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ 1 ] [ ] [ ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
[ 2 ] [ ] [ ]	
[ 3 ] [ ] [ ]	Default Sex:
[ 4 ] [ ] [ ]	[ • ] Male [ ] Female
[ 5 ] [ ] [ ]	Range:
[ 6 ] [ ] [ ]	[ ] Range 1 [ ] Range 2 [ ] Range 3 [ ]

### Application - Autres

Standard: [ 1 ] [ 2 ] [ 3 ] [ 4 ] [ 5 ] [ 6 ]
Calib. Code: [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ]
Concentration
(% of Cal value): [ 000 ] [ 16.6% ] [ 38.5% ] [ 71.4% ] [ 125% ] [ 250% ]
Rack No. Position: [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ]
Sample Volume: [ 8 ] [ 5 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ]
Diluted S. Volume: [ 0 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ]
Diluent Volume: [ 0 ] [ 145 ] [ 240 ] [ 120 ] [ 60 ] [ 20 ]

### Lavage spécial - Edit Cell

Test	Type	R1	Volume	Type	R2	Volume
[ Kappa ]	[ D1 ]		[ 270 ]	[ D1 ]		[ 270 ]

\* Les canaux ouverts du Modular P n'utilisent pas la solution Saline Roche comme diluant. Une bouteille supplémentaire de solution saline doit être manuellement enregistrée dans le canal de test (ex. : FKAP) comme un réactif « DIL ». Retirer l'étiquette de la bouteille de

solution Saline Roche et la remplacer par une étiquette de bouteille pour canal ouvert. La solution saline devra être manuellement attribuée au canal de test avec un réactif de type « DIL » et positionnée dans le cercle extérieur du carrousel réactif ex. : position 1-8. UNIQUEMENT après l'enregistrement manuel, vous devez placer le diluant et d'autres réactifs à bord de l'automate puis réaliser l'enregistrement du niveau de réactif. Ce nouveau diluant peut-être utiliser pour un autre test en canal ouvert en utilisant la même référence de bouteille de diluant (311-400 ou 901-910) dans la page de paramètres appropriée « Utility-Application-Analyse ».

**NB :** Les utilisateurs doivent rentrer les Limites Techniques de chaque nouveau coffret comme spécifié sur le feuillet supplémentaire (SIN060.DS), spécifique du lot, joint à la fiche technique

**NB :** Les utilisateurs doivent uniquement utiliser les volumes exacts de calibrateurs et de contrôles comme indiqué ci-dessous :

- Utiliser 500µL de calibrateur Kappa Libre par calibration dans une cupule à échantillon.
- Utiliser 100µL de contrôle Kappa Libre par test dans une cupule à échantillon.
- Utiliser 100µL de contrôle haut Kappa Libre par test dans une cupule à échantillon.

### 8.4.5 Gamme de mesure

Tous les échantillons doivent être mesurés en premier en utilisant la dilution échantillon standard 1/5 donnat une gamme approximative de 3,7-56,2mg/L. Cela permettra une sensibilité est de 0,8mg/L sur des échantillons non dilués. La limite supérieure de la gamme de mesure est 562mg/L en utilisant une dilution échantillon au 1/50. Pour des échantillons dont la concentration est supérieure à la courbe avec une dilution machine au 1/50, nous suggérons de faire hors machine les dilutions en série suivantes afin de minimiser les tests:

Dilution totale	Dilution machine	Dilution manuelle	Gamme approximative (mg/L)
1/1	1/1	-	0,8 – 11,2
1/5	1/5	-	3,7 – 56,2
1/50	1/50	-	37 – 562
1/500	1/5	1/100*	370 – 5620
1/5000	1/50	1/100*	3700 – 56200

\* Faire une dilution manuelle au 1/100 en prenant 100µL d'échantillon et en ajoutant 900µL de diluant échantillon système pour obtenir une dilution au 1/100. Répéter pour obtenir une dilution finale au 1/100. Tester l'échantillon dilué au 1/100. Multiplier le résultat par 100.

## 9 CONTROLE DE QUALITE

Les contrôles fournis doivent être utilisés dans chaque série. La concentration en kappa libre des contrôles est indiquée sur le feuillet supplémentaire (SIN060.DS) joint à fiche technique. Les résultats obtenus au cours du test ne doivent être pris en compte que si les résultats des contrôles sont à ±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'appareil et les paramètres du protocole doivent être vérifiés avant de répéter le test. Si le problème persiste contacter le fournisseur.

## 10 LIMITES

- Les tests en turbidimétrie ne sont pas utilisables pour la mesure d'échantillons hautement lipidiques ou hémolysés ainsi que pour des échantillons contenant des taux élevés de complexes immuns circulants (CIC) du fait du degré non prévisible de réaction non spécifique que de tels échantillons peuvent générer. Des résultats inattendus doivent être confirmés par une autre méthode.
- 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.
- Excès d'Antigène :** Un faible nombre d'échantillons contenant des concentrations élevées en kappa libre ou lambda libre peut donner un résultat faussé pour la chaîne légère impliquée dû à un excès d'antigène. 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. Dans une très grande majorité de cas, la concentration de la chaîne légère impliquée à une valeur supérieure aux valeurs normales (3,30-19,40mg/L pour kappa libre et 5,71-26,30mg/L pour lambda libre) et/ou la concentration de la chaîne légère opposée à une valeur inférieure aux valeurs normales et/ou le rapport kappa libre sur lambda libre est en dehors des valeurs normales (0,26-1,65). Si une des conditions ci-dessous est rencontrée, un échantillon devra être testé à la dilution initiale et avec une prédilution manuelle au 1/100 (voir section 8.4.5) pour détecter tout excès d'antigène.
  - l'échantillon a soit une concentration en CLL ou un rapport CLL kappa/CLL lambda en dehors des gammes de mesures
  - l'échantillon provient d'un patient ayant déjà présenté un excès d'antigène ou
  - les résultats de l'échantillon ne sont pas en adéquation avec les autres résultats cliniques.
- Les CHLL possèdent une combinaison unique d'acides aminés. Ainsi, il est théoriquement possible que certaines protéines monoclonales soient indétectables par immunoenzymatique, provoquant des résultats plus faibles que prévus. En pratique cela ne se produit que très rarement avec le test Freelite. Les échantillons suspects doivent d'abord être testés pour l'excès d'antigène (voir section 10.3 ci-dessus) puis par d'autres techniques d'analyse (immunofixation et électrophorèse des protéines sériques).
- 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 : 1/5, 1/50, 1/500 et 1/5000 (voir section 8.4.5). Ne pas sauter ou omettre une de ces dilutions.
- 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 ces 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.
- Les utilisateurs doivent être conscients que l'utilisation d'une solution de NaOH et qu'un lavage régulier avec une solution spéciale de lavage sont essentiels pour éviter que les cuvettes s'opacifient.

## 11 VALEURS ATTENDUES

Les gammes indiquées ci-dessous 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 sérums d'adultes sains sur un BN™II\*<sup>(1)</sup>. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Sérums d'adultes sains	Conc. moyenne	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 complète</b>
Rapport Kappa/Lambda	0,63	0,60	0,26 - 1,65 (mg/L)

Afin de montrer l'équivalence des gammes normales obtenues avec les tests sur BNII et sur Hitachi, nous avons testé 100 échantillons issus de donneurs de sang sains âgés de 20 à 60 ans et 54 sérums de patients avec les coffrets **Freelite** sur BNII et sur Hitachi. Les résultats de l'analyse de régression sont les suivants : pour le test kappa libre :  $y=0,94x + 2,85$ ,  $r=0,96$ , et pour le test lambda libre :  $y=0,99x + 0,46$ ,  $r=0,99$  ( $y$  = valeur Hitachi,  $x$  = valeur BNII). Cette étude montre que les données plus importantes obtenues par la Mayo clinique sont applicables aux tests sur Hitachi.

\*BN™II est une marque déposée par Siemens Healthcare Diagnostics Inc.

### 11.2 Résultats d'urines normales

Les concentrations urinaires en chaînes légères libres ont été mesurées à partir d'échantillons de 58 donneurs de sang sains. Un certain nombre d'échantillons étaient en-dessous de la gamme de mesure des dosages en kappa libre et lambda libre. Une gamme complète a été établie.

Urines d'adultes sains	% d'échantillons d'urines en dessous du seuil de détection	Gamme complète (en mg/L)
Kappa libre	10	<0,78 - 13,48
Lambda libre	62	<2,22 - 5,9

## 12 PERFORMANCES

### 12.1 Précision intra-essai

3 sérums contenant des taux différents de chaînes légères libres kappa ont été testés. Chaque valeur donnée a été calculée à partir de 10 mesures faites lors de la même série. Toutes les concentrations sont données en mg/L.

	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 3
Moyenne	8,2	30,0	48,9
CV%	8,02	3,71	2,95

### 12.2 Précision inter-essai

3 préparations de sérums contenant des taux différents de chaînes légères libres kappa ont été testés lors de 10 tests différents en utilisant des coffrets provenant d'un seul lot. Toutes les concentrations sont données en mg/L.

	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 3
Moyenne	6,7	18,2	35,3
CV%	7,32	4,11	5,74

### 12.3 Linéarité

La linéarité de ce test a été confirmée en utilisant des dilutions en série d'un sérum. L'équation de régression obtenue est  $y = 1,01x - 0,02$  (mg/L),  $r = 1,00$  ( $y$ =concentration mesurée de kappa libres,  $x$ =concentration théorique).

### 12.4 Interférences

Des interférences minimales ont été trouvées avec la bilirubine à 200mg/L (-0,82%), l'hémoglobine à 5g/L (6,2%) et le chyle à 2,5% (5,8%) et un sérum de contrôle kappa libre à 25mg/L.

### 12.5 Comparaison

**Sérums** : 54 sérums (10 normaux et 44 sérums issus de patients avec un myélome multiple ou une amylose) ont été testés avec les coffrets **Freelite** kappa et lambda sur un BNII et 3 coffrets commerciaux d'immunofixation (IFE). Les échantillons cliniques ont été testés dans un grand centre indépendant aux USA.

	Résultats Freelite				Résultats IFE
	Kappa libre	Lambda libre	Rapport κ/λ libres	Résumé	
Sérums normaux (10)	10 normaux	10 normaux	9 normaux 1 haut limite	10 normaux	10 normaux
Sérums de myélomes/ amylose (24)	24 hauts	12 normaux 12 bas	24 hauts	24 kappa monoclonales	19-24* montrent une bande monoclonale
Sérums de myélomes/ amylose (20)	10 normaux 10 bas	15 hauts 5 normaux	20 bas	20 lambda monoclonales	12-14* montrent une bande monoclonale

\*dépendant de la méthode

Tous les sérums ayant des concentrations anormales en chaînes légères ont été détectés avec les coffrets **Freelite** tandis que certains ne sont pas détectés avec les méthodes IFE moins sensibles.

**Urines** : 28 urines (9 normales et 19 issues de patients suspectés ou connus pour avoir un myélome) ont été testés avec les coffrets **Freelite** kappa et lambda et un coffret commercial d'immunofixation (IFE).

	Résultats Freelite				Résultats IFE
	Kappa libre	Lambda libre	Rapport κ/λ libres	Résumé	
Urines normales (9)	7 normaux 2 hauts limite	4 normaux 5 hauts limite	8 normaux 1 haut limite	9 normaux	9 normaux
Urines de myélomes kappa (9)	9 hauts	4 hauts 5 hauts limite	8 hauts 1 normal	9 kappa monoclonales	9 montrent une/des bande(s) monoclonale(s)
Urines de myélomes lambda (10)	7 hauts 3 normaux	10 hauts	10 bas	10 lambda monoclonales	10 montrent une bande monoclonale

Toutes les urines ayant des concentrations anormales en chaînes légères ont été détectées avec les coffrets **Freelite** et les tests IFE.

## 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.
- Katzman 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
8	Metodología
9	Control de calidad
10	Limitaciones del procedimiento
11	Valores esperados
12	Características del rendimiento
13	Bibliografía

## Freelite® Kit Kappa Libre Humano Para el uso en los analizadores Hitachi 911/921/917 y Modular P

### Para uso diagnóstico *in-vitro*

**Código producto: LK016.H**

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

The Binding Site Group Limited Sucursal en España  
Bruc 72 2ª planta, 08009 Barcelona, España  
Teléfono 902027750  
Fax: 902027752  
e-mail: info@bindingsite.es  
web: www.bindingsite.es

En Europa y EE.UU. Freelite® es una marca de The Binding Site Group Ltd., Birmingham, RU.



#### 1 APLICACIÓN

Este kit tiene como objetivo la cuantificación en suero y orina de las cadenas ligeras libres kappa en el Hitachi 911, Hitachi 912, Hitachi 917 y Modular P 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, amiloidosis AL, síndrome de deposición de cadenas ligeras y enfermedades del tejido conjuntivo como por ejemplo el lupus eritematoso sistémico (SLE), junto con otras determinaciones clínicas y de laboratorio.

#### 2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las moléculas de inmunoglobulinas se componen de dos cadenas pesadas idénticas ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y  $\mu$ ) 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 kappa ( $\kappa$ -FLC) mayormente como monómero, la cadena ligera libre Lambda ( $\lambda$ -FLC) como dímero covalentemente ligado, con un peso molecular de aproximadamente 45kD. Esto conlleva a un índice de filtración glomerular para  $\kappa$ -FLC y  $\lambda$ -FLC distinto, lo que podría ser una posible explicación para la relación  $\kappa$ -FLC /  $\lambda$ -FLC de 0,625 encontrada en el suero comparada con la relación  $\kappa$  /  $\lambda$  de 2,0.

La concentración FLC es baja en la orina. En un riñón sano todas las FLC se reabsorben por las células tubulares, por lo tanto su presencia en la orina es debida a una secreción en el tracto de la orina.

Una concentración elevada de las cadenas ligeras libres monoclonales en suero está asociada con mieloma múltiple, amiloidosis AL y síndrome de deposición de cadenas ligeras. La aparición de concentraciones elevadas de cadenas ligeras libres en la orina pueden indicar una enfermedad del riñón o una enfermedad de proliferación maligna linfática, como por ejemplo mieloma múltiple. Las cadenas ligeras libres monoclonales eliminadas con la orina se denominan proteínas Bence Jones<sup>(1-13)</sup>.

#### 3 PRINCIPIO

Para la determinación de un antígeno soluble mediante turbidimetría se añade la muestra a una solución conteniendo el anticuerpo correspondiente. Durante la reacción antígeno-anticuerpo un rayo de luz pasa a través de la cuvette y aumenta mientras que se forman complejos inmunológicos insolubles. La dispersión de la luz se monitoriza midiendo la disminución de la intensidad del haz de luz incidente. El anticuerpo es en exceso, por tanto la cantidad del complejo inmunológico formado es proporcional a la concentración del antígeno. Se utiliza una serie de calibradores con concentración de antígeno conocida para realizar una curva de calibración. Con la luz defundida respecto a la concentración de antígeno. Las muestras con concentración de antígeno desconocida pueden ensayarse y los resultados pueden leerse en 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 que aumente la señal de difusión de la luz de la reacción antígeno-anticuerpo.

#### 4 REACTIVOS

- 4.1 **Reactivo Látex:** anticuerpo mono específico, policlonal fijado a partículas látex poliestireno. Conservantes incluido: 0,05% 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 kappa. Se suministran en forma líquida estable. Conservantes: 0,099% de azida sódica, 0,1% EACA y 0,01% de Benzamidina.
- 4.3 **Reactivo adicional:** conservante: 0,099% de azida sódica.

\*ProClin™ es una marca registrada 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.



**Application – Calibration**

Calibration Type: [ Logit-Log (4p) ]	<u>Auto-Calibration</u>
Point: [ 6 ]	Time Out
Span Point: [ 6 ]	[ ] Blank [ ]
Weight: [ 0 ]	[ ] Span [ ]
	[ ] 2 Point [ ]
	[ ] End [ ]
SD Limit: [ 999.9 ]	<u>Change Over</u>
Duplicate Limit: [ 99 ] % [ 32000 ] Abs	Module [ ]
Sensitivity Range: [-99999 ] - [ 99999 ]	Lot [ ]
Sf. Abs. Range: [-32000 ] - [ 32000 ]	Bottle [ ]

**Application – Range**

App Code: [ *** ]	<u>Expected Range</u>
Unit: [ mg/L ]	Male
Report Name: [ Kappa Free ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Data Mode: [ Active ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Technical Limit: [ STD2 CONC ] [ STD6 CONC ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
Repeat Limit: [-99999 ] - [ 99999 ]	Female
[ ] Control Time Interval [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ ] Qualitative [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ 1 ] [ ] [ ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
[ 2 ] [ ] [ ]	Default
[ 3 ] [ ] [ ]	Sex:
[ 4 ] [ ] [ ]	[ • ] Male [ ] Female
[ 5 ] [ ] [ ]	Range:
[ 6 ] [ ] [ ]	[ ] Range 1 [ ] Range 2 [ ] Range 3 [ ]

**Application – Others**

Standard: [ 1 ] [ 2 ] [ 3 ] [ 4 ] [ 5 ] [ 6 ]
Calib. Code: [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ]
Concentration
(% of Cal value): [ 000 ] [ 16.6% ] [ 38.5% ] [ 71.4% ] [ 125% ] [ 250% ]
Rack No. Position: [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ]
Sample Volume: [ 8 ] [ 5 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ]
Diluted S. Volume: [ 0 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ]
Diluent Volume: [ 0 ] [ 145 ] [ 240 ] [ 120 ] [ 60 ] [ 20 ]

**Special Wash – Edit Cell**

Test	Type	R1	Volume	Type	R2	Volume
[ Kappa ]	[ D1 ]	[ 270 ]	[ D1 ]	[ 270 ]		

**8.4.4 Parámetros (Modular P)**

**Application - Analyze**

Select Test: [ Kappa ]	
Assay/Time/Point [ 2 point end ] [ ] [ 10 ] [ 7 ] [ 34 ] [ 0 ] [ 0 ]	
Wavelength (2 <sup>nd</sup> /Primary): [ ] [ 600 ]	
<u>Sample Volume</u>	<u>Reagent</u>
Normal: [ 20 ] [ 8 ] [ 80 ] R1: [ 150 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] Timing	
Decrease: [ 3 ] [ 8 ] [ 147 ] R2: [ 90 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] [ ]	
Increase: [ 8 ] [ 0 ] [ 0 ] R3: [ 0 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] [ ]	
	R4: [ 0 ] [ 0 ] [ ***** ] [ 0 ] [ ]
<u>Diluent</u>	
[ ] Water	
[ • ] Diluent [ 311 ] *	
Abs Limit: [ 32000 ] [ Increase ]	
Prozone Limit: [ 32000 ] [ 0 ] [ 0 ] [ 0 ] [ Upper ]	
Cell Detergent: [ Detergent 1 ]	
Twin Test: [ ]	

**Application – Calibration**

Calibration Type: [ Logit-Log (4p) ]	<u>Auto-Calibration</u>
Point: [ 6 ]	Time Out
Span Point: [ 6 ]	[ ] Blank [ ]
Weight: [ 0 ]	[ ] Span [ ]
	[ ] 2 Point [ ]
	[ ] End [ ]
SD Limit: [ 999.9 ]	<u>Change Over</u>
Duplicate Limit: [ 99 ] % [ 32000 ] Abs	Module [ ]
Sensitivity Range: [-99999 ] - [ 99999 ]	Lot [ ]
Sf. Abs. Range: [-32000 ] - [ 32000 ]	Bottle [ ]

**Application - Range**

App Code: [ *** ]	<u>Expected Range</u>
Unit: [ mg/L ]	Male
Report Name: [ Kappa Free ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Data Mode: [ Active ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
Technical Limit: [ STD2 CONC ] [ STD6 CONC ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
Repeat Limit: [-99999 ] - [ 99999 ]	Female
[ ] Control Time Interval [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ ] Qualitative [ ]	[ 100 ] [ Year ] [ -99999 ] [ 99999 ]
[ 1 ] [ ] [ ]	[ -99999 ] [ 99999 ]
[ 2 ] [ ] [ ]	Default
[ 3 ] [ ] [ ]	Sex:
[ 4 ] [ ] [ ]	[ • ] Male [ ] Female
[ 5 ] [ ] [ ]	Range:
[ 6 ] [ ] [ ]	[ ] Range 1 [ ] Range 2 [ ] Range 3 [ ]

**Application - Others**

Standard: [ 1 ] [ 2 ] [ 3 ] [ 4 ] [ 5 ] [ 6 ]
Calib. Code: [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ] [ *** ]
Concentration
(% of Cal value): [ 000 ] [ 16.6% ] [ 38.5% ] [ 71.4% ] [ 125% ] [ 250% ]
Rack No. Position: [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ] [ ** ]
Sample Volume: [ 8 ] [ 5 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ] [ 20 ]
Diluted S. Volume: [ 0 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ] [ 8 ]
Diluent Volume: [ 0 ] [ 145 ] [ 240 ] [ 120 ] [ 60 ] [ 20 ]

**Special Wash – Edit Cell**

Test	Type	R1	Volume	Type	R2	Volume
[ Kappa ]	[ D1 ]	[ 270 ]	[ D1 ]	[ 270 ]		

\* Los canales abiertos del Modular P no usarán Salino de Roche como diluyente. Se debe registrar manualmente en el canal de test una botella adicional de salino (FKAP) como reactivo 'DIL'. Quite la etiqueta de una botella de Salino de Roche y sustitúyala por la etiqueta de una botella para canal abierto. El salino se tendrá que asignar manualmente al canal de test con un reactivo tipo 'DIL' y posicionarlo en el anillo externo del carrusel, como por ejemplo en la posición 1-8. ÚNICAMENTE tras el registro manual se puede colocar el diluyente y otros reactivos en el instrumento, y entonces realizar un Registro de Nivel de Reactivo. Este nuevo diluyente se puede usar para otro ensayo de canal abierto utilizando el mismo Código de Botella de Diluyente (311-400 o 901-910) en la página Utility-Application-Analyze que corresponda en los parámetros.

**NB:** Los usuarios deben introducir el Límite Técnico de cada kit nuevo tal y como se indica en la Hoja de Datos de Producto específica de lote que acompaña al kit, SIN060.DS.

**NB:** Los usuarios deben usar volúmenes exactos de calibradores y controles tal y como se indica a continuación:

- Usar 500µL de calibrador Kappa Libre por calibración en un tubo de muestras.
- Usar 100µL de control Kappa Libre por test en un tubo de muestras.
- Usar 100µL de Control Alto Kappa Libre por test en un tubo de muestras.

**8.4.5 Rango de medición**

Todas las muestras se deben analizar primero a la dilución estándar de 1/5, dando un rango de medición aproximado de 3,7-56,2mg/L. Esto hace posible una sensibilidad de 0,8mg/L en muestras puras de suero. El límite superior del rango de medición usando una dilución de 1/50 es 562mg/L. Para muestras con una mayor concentración hay que usar las siguientes series de pre-dilución para minimizar el gasto de kits:

Dilución total	Dilución automatizada	Dilución fuera de línea	Rango aproximado (mg/L)
1/1	1/1	-	0.8 – 11.2
1/5	1/5	-	3.7 – 56.2
1/50	1/50	-	37 – 562
1/500	1/5	1/100*	370 – 5620
1/5000	1/50	1/100*	3700 – 56200

\* Haga una predilución manual de 1/100 cogiendo 100µL de muestra y añada 900µL de diluyente para conseguir una dilución inicial de 1/10. Entonces, coja 100µL de esta dilución y añada 900µL de diluyente de muestra del sistema para conseguir una dilución final de 1/100. Lleve la muestra diluida al 1/100 para análisis. Multiplique el resultado x 100.

**9 CONTROL DE CALIDAD**

Los controles suministrados se deben incluir en todas las ejecuciones del ensayo. La concentración de kappa libre correspondiente está indicada en la Hoja de Datos de Producto que acompaña al kit (SIN060.DS). Los resultados deben ser solo 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 recomienda calibrar de nuevo el test. Si aún después de la nueva calibración estuviera fuera de rango, deberá verificarse el instrumento y los parámetros programados. Si no se solucionara el problema, rogamos se dirijan a su proveedor.

**10 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

- Los tests turbidimétricos no son adecuados para la determinación de muestras altamente lipémicas o hemolíticas o muestras que contengan complejos inmunes circulantes, dado que estas muestras pueden producir una cantidad impredecible de luz parásita no especificable. Los resultados no previstos deberán verificarse con un método alternativo.
- El diagnóstico y el comienzo de una terapia no deben basarse únicamente y exclusivamente en la determinación de las cadenas ligeras libres. Asimismo se debe tener en cuenta el cuadro clínico así como otros análisis.
- Exceso de antígeno:** Aunque se usan numerosos mielomas para establecer los límites de reacción de prozona, la naturaleza impredecible de los clones individuales comporta que el exceso de antígeno sea una posibilidad. 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. En casi todos los casos la concentración de la cadena ligera presente en cantidad elevada resultará por encima del rango de normalidad previsto (3,30-19,40mg/L para las cadenas libres Kappa y 5,71-26,30mg/L para las cadenas libres Lambda) y/o la concentración de la cadena ligera opuesta resultará por debajo del rango de normalidad previsto y/o la relación de las cadenas Kappa libre/Lambda libre resultará fuera del rango previsto (0,26-1,65). Cualquier muestra deberá ensayarse siempre con dos diluciones, dilución inicial y también a una pre-dilución manual de 1/100 (ver sección 8.4.5) para detectar el exceso antigénico si se da cualquiera de las siguientes condiciones:
  - Cualquier muestra que manifieste una concentración de cadenas ligeras libres o una relación Kappa libre/Lambda libre fuera del rango previsto
  - Cualquier muestra que provenga de un paciente que previamente haya manifestado exceso antigénico
  - o
  - Un resultado que no concuerde con los otros datos clínicos o de laboratorio:
- Las CLLS contienen 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**. Primero se debe analizar si las muestras sospechosas contienen exceso antigénico (ver sección 10.3) y posteriormente someterlas a análisis adicionales (inmunofijación y electroforesis de proteínas séricas).
- 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 1/5, 1/50, 1/500, 1/5000 – (ver sección 8.4.5). Se debe evitar la omisión de algún paso de dilución o el uso de diluciones alternativas.
- 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.
- El cliente ha de ser consciente de que el uso de la solución NAOHD tanto en lavado especial como en lavado normal es esencial para prevenir que se empañen las cubetas.

## 11 VALORES ESPERADOS

Los rangos de valores indicados a continuación se obtuvieron comenzando de un número limitado de muestras y deben considerarse únicamente como un ejemplo. Se recomienda crear sus propios rangos locales.

### 11.1 Rangos de valores en suero de adultos

Se analizaron los sueros de 282 sujetos sanos con edades comprendidas entre los 20 y los 90 años con los kits **Freelite** de The Binding Site para BN™II\* (11). Los resultados se muestran en la tabla a continuación:

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)
	Conc. media	Conc. mediana	Rango total
Relación kappa/lambda	0,63	0,60	0,26 – 1,65

Con el objetivo de demostrar la equivalencia del rango de normalidad obtenido con el BNII y el Hitachi se ensayaron 100 sueros de donantes sanos de edades comprendidas entre 20 y 60 años y 54 sueros patológicos tanto con el kit BNII como con el kit **Freelite** Hitachi. Los resultados del análisis de regresión son los siguientes: para el ensayo kappa,  $y=0,94x + 2,85$ ,  $r=0,96$ , y para el ensayo lambda  $y=0,99x + 0,46$ ,  $r=0,99$  ( $y$  = valor en el Hitachi,  $x$  = valor en el BNII). Esto demuestra que los datos obtenidos en la Clínica Mayo, son también aplicables al Hitachi.

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

### 11.2 Adultos – valores normales en orina

Se analizaron las concentraciones de cadenas ligeras libres en 58 muestras de orina de donantes sanos. Tanto en kappa libre como lambda libre, hubo un número de muestras que dieron un resultado por debajo del rango de medición del ensayo. Se ha mencionado un rango total disponible

Orina adulto normal	Muestras por debajo del límite de detección (%)	Rango total (mg/L)
Kappa Libre	10	<0.78 - 13.48
Lambda Libre	62	<2.22 - 5.9

## 12 CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

### 12.1 Precisión intraensayo

Se ensayaron tres sueros con valores diferentes de cadenas ligeras libres kappa. Cada valor indicado se ha calculado en 10 mediciones de una misma serie de análisis. Todas las concentraciones son en mg/L.

	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Valor medio	8,2	30,0	48,9
CV%	8,02	3,71	2,95

### 12.2 Precisión interensayo

Se ensayaron tres sueros con valores diferentes de kappa libre en 10 mediciones en series separadas, utilizando kits procedentes del mismo lote. Todas las concentraciones son en mg/L.

	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Valor medio	6,7	18,2	35,3
CV%	7,32	4,11	5,74

### 12.3 Linealidad

La linealidad del ensayo ha sido confirmada por medición de diluciones en serie de un suero: recta de regresión:  $y = 1,01x - 0,02$  (mg/L),  $r = 1,00$ . ( $y$  = concentración medida de kappa libre,  $x$  = concentración teórica).

### 12.4 Substancias interferentes

En una medición de control de Kappa libre (25mg/L), se encontraron interferencias insignificantes en 200mg/L bilirubina (-0,82%), 5g/L hemoglobina (6,2%) y 2,5mg/L quilo (-5,8%).

### 12.5 Estudio comparativo

**Suero:** Se analizaron 54 sueros (10 normales, 44 de pacientes conocidos con mieloma múltiple o amiloidosis) con kits **Freelite** BN II Kappa y Lambda y con tres kits comerciales de electroforesis de inmunofijación (IFE). Las muestras clínicas (44) se evaluaron en un centro de referencia independiente de EE.UU.

	Resultados Freelite			Resumen	Resultado IFE
	Kappa Libre	Lambda Libre	Relación κ/λ libre		
Suero normal (10)	10 normales	10 normales	9 normales 1 valor límite alto	10 normales	10 normal
Sueros mieloma/ amiloidosis (24)	24 altos	12 normales 12 bajos	24 altos	24 Kappa monoclonales	19-24* muestran bandas monoclonales
Sueros mieloma/ amiloidosis (20)	10 normales 10 bajos	15 altos 5 normales	20 bajos	20 Lambda monoclonales	12-14* muestran bandas monoclonales

\*Dependiente del método

Todas las concentraciones anormales de cadenas ligeras en suero fueron detectadas con el kit **Freelite**, mientras que con métodos IFE algunas no se detectaron.

**Orina:** Se analizaron 28 orinas (9 normales, 19 de pacientes conocidos/supuestos con mieloma) con kits **Freelite** Kappa y Lambda y un método comercialmente disponible de electroforesis de inmunofijación (IFE).

	Resultados Freelite			Resumen	Resultados IFE
	Kappa libre	Lambda libre	Relación κ/λ libre		
Orina normal (9)	7 normales 2 valor límite altos	4 normales 5 valor límite altos	8 normales 1 valor límite alto	9 normales	9 normales
Orina Kappa mieloma (9)	9 altos	4 altos 5 valor límite altos	8 altos 1 normal	9 Kappa monoclonales	9 muestran bandas monoclonales
Orina Lambda mieloma (10)	7 altos 3 normales	10 altos	10 bajos	10 Lambda monoclonales	10 muestran bandas monoclonales

Todas las concentraciones anormales de cadenas ligeras en suero fueron detectadas tanto con los kits **Freelite** así como de los IFE.

## 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.