Nieves SANZ Asesora Científica

Sebia FLC Presentación de los nuevos kits ELISA



The new language of life

Contenido

PARTE 1: Introducción

- Criterios diagnósticos de MGUS, SMM y MM
- Estudios recomendados para el diagnóstico
- Que son las cadenas livianas libres (CLL) ?
- Interés de la medición de CLL
- Métodos para la medición de CLL





PARTE 2: KITS sebia FLC

- Principio del método
- Etapas de la técnica
- Composición de los kits
- Controles de calidad
- Diseño de la microplaca
- Muestras para el análisis
- Criterios de validación de la técnica
- Valores de referencia
- Opciones de instrumentos para la realización de la técnica sebia FLC
- Características analíticas

Introducción

• A principios de la década del 2000, se introduce la prueba de cadenas livianas libres (CLL) en suero lo que hizo avanzar fuertemente el diagnóstico de las gammopatías monoclonales.

 Desde entonces, el análisis de CLL en suero se convirtió en una prueba complementaria cada vez más importante en el manejo de pacientes con gammopatías monoclonales.

• Las CLL en suero ha demostrado su **valor clínico** en el contexto del cribado, el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento de la respuesta a la terapia.

Criterios diagnósticos (a partir del año 2014)

Criterios	MGUS	SMM	MM
Concentración de la proteína monoclonal en suero	< 30 g/L	≥ 30 g/L*	Sin umbral
% de células plasmáticas en medula ósea	< 10 %	10 – 60 %*	≥ 10 %
Concentración de la proteína monoclonal en orina		≥ 500 mg/24hs*	
Daño de órgano blanco (CRAB)	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE
SLIM	AUSENTE	AUSENTE	 Células plasmáticas en médula ósea > 60% Relación entre CLL involucrada y no involucrada > 100 > 1 lesión focal en RMN (≥ 5 mm)

^{*} Al menos 1 de los 3 criterios debe estar presente

Estudios recomendados para el diagnóstico de mieloma

- Historia del paciente y examen físico
- Hemograma completo y frotis
- Electroforesis de proteínas séricas e inmunofijación
- Cuantificación de inmunoglobulinas por nefelometría
- Electroforesis de proteínas urinarias e inmunofijación (orina de 24 horas)
- Cuantificación del pico monoclonal
- Calcio y Creatinina

- β2 microglobulina
- Lactato deshidrogenasa
- Cadenas livianas libres (CLL) en suero
- Aspirado y / o biopsia de médula ósea
- Citogenética (cariotipo en metafase y FISH)
- Estudio radiológico óseo: columna, pelvis, cráneo, húmero y fémur
- Imágenes de resonancia magnética en determinadas circunstancias



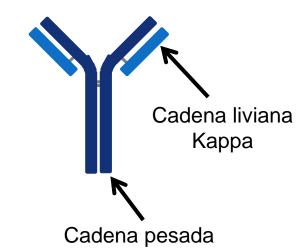




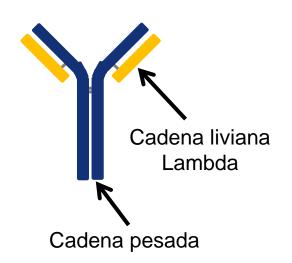


Que son las CLL?

- Una inmunoglobulina (Ig) completa consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas idénticas.
- Existen cinco clases de Ig que definen la cadena pesada (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) y dos clases de cadena liviana, kappa (κ) y lambda (λ).
- Las cadenas pesadas y livianas de la Ig completa se sintetizan de forma asincrónica y se ensamblan dentro del los linfocitos B con una producción de cadenas livianas entre un 10 y un 40% mayor que la de las cadenas pesadas.
- Este exceso de producción, es excretado en forma libre en el suero por las células plasmáticas, lo que representa aproximadamente 500 mg / día de cadenas livianas libres (CLL) policionales.





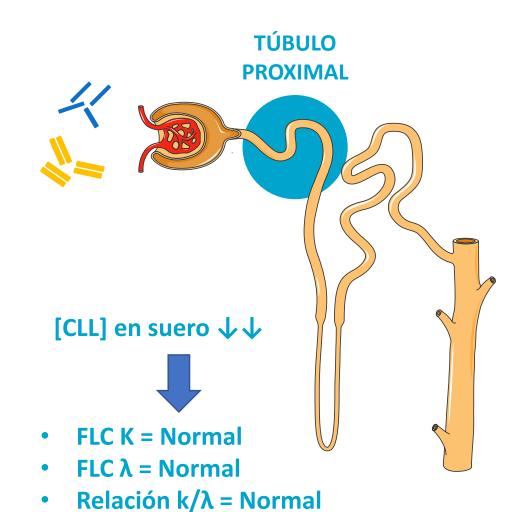




Cadenas livianas libres Lambda (45 kDa)

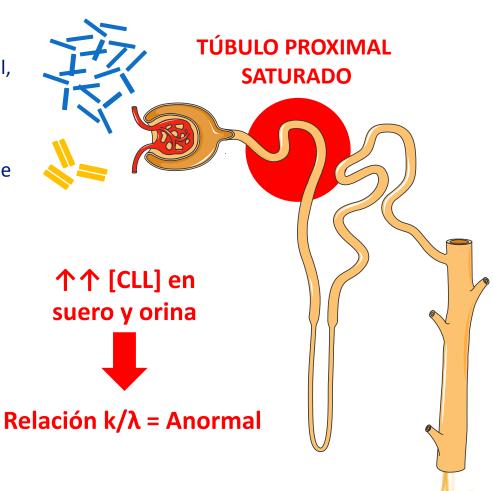
Que son las CLL?

- La concentración de CLL en el suero depende de la cantidad sintetizada por las células plasmáticas y del clearence renal.
- La vida media de las CLL es de 2-6 horas (en comparación con 21 días para la IgG)
- Las CLL se filtran rápida y libremente por los glomérulos y luego se reabsorben casi por completo a nivel del túbulo proximal por endocitosis, donde son catabolizadas en aminoácidos.
- Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, la cantidad de CLL excretadas en orina es muy baja (aproximadamente 1-10 mg / día).



Aumento de la producción de CLL

- **Aumento policional (relación κ / \lambda = Normal)**
- En caso de aumento de CLL indica una proliferación de linfocitos B policionales.
- Causas:
- Enfermedades autoinmunes, infecciones virales crónicas
- Disminución de la filtración glomerular de Ig policional (insuficiencia renal, vejez)
- \triangleright Aumento monoclonal (relación κ / λ = anormal)
- Exceso de producción del mismo isotipo de CLL, vinculado a la proliferación de un clon de linfocitos B.
- Múltiples causas:
- Mieloma,
- MGUS,
- Leucemia linfoide crónica (LLC),
- Enfermedad de Waldenström (MW)
- Amiloidosis asociada con cadenas livianas (AL),
- Plasmocitoma



Interés de la medición de CLL en suero

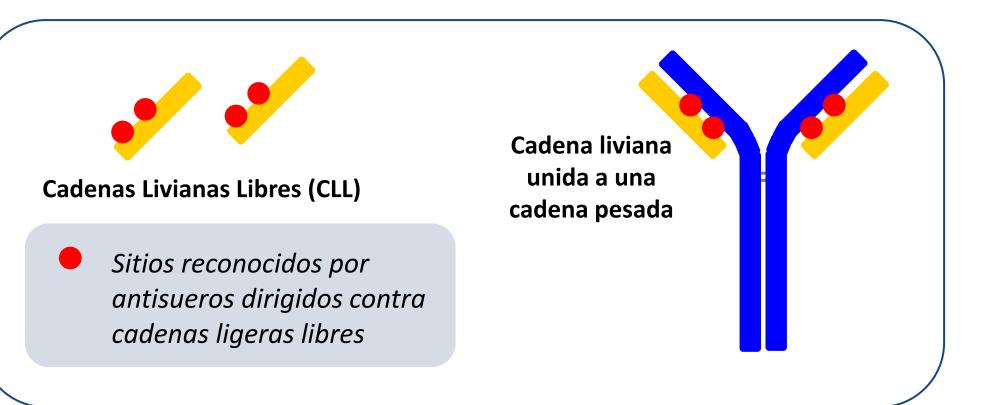
- **Diagnóstico** de gammapatías monoclonales, especialmente en presencia de CLL monoclonales (amiloidosis AL, mieloma oligosecretor)
- Seguimiento del paciente
- Pronóstico y estratificación del riesgo
- Marcador de remisión y la detección temprana de recaídas debido a la corta vida media de la CLL

Medición de CLL en suero

	FREELITE	N LATEX FLC	DIAZYME	SERALITE	sebia FLC
Método	Inmunoensayo potenciado con látex	Inmunoensayo potenciado con látex	Inmunoensayo potenciado con látex	Inmunocromatografía competitiva	ELISA sandwich
Anticuerpos	Policlonales	Monoclonales	Policionales	Monoclonales	Policlonales
Instrumento	Nefelometría Turbidimetría	Nefelometría	Turbidimetría	Lector ADxLR5	Manual Plataforma ELISA

Medición de CLL en suero

 Uso de antisueros específicos que reconocen <u>únicamente</u> las cadenas livianas libres <u>no unidas</u>







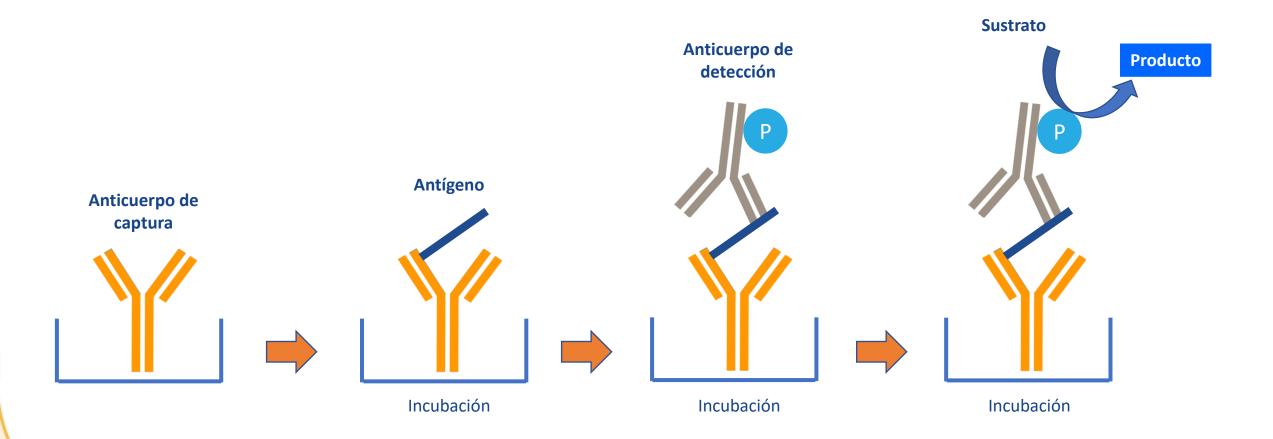
Kits sebia FLC

Una plataforma novedosa para el análisis CLL en suero

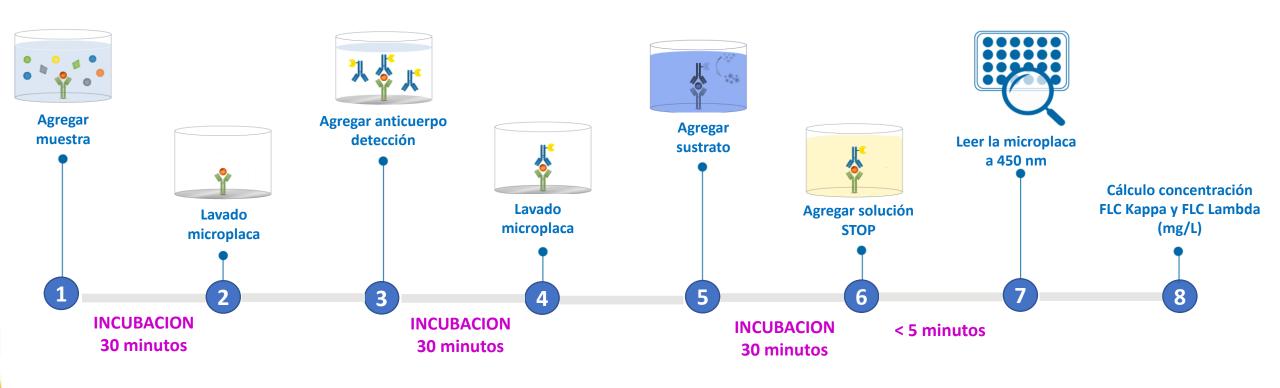


The new language of life

Principio del método: ELISA sandwich



Método ELISA: 8 etapas sucesivas



Kit FLC Kappa



ITEMS	PN 5102	
Microplaca Kappa (lista para usar)	1 microplaca de 12 segmentos con 8 pocillos cada uno	
Tampón de dilución (listo para usar)	1 vial de 100 mL	
Solución de lavado (solución concentrada)	1 vial de 100 mL	
Calibradores Kappa (listos para usar)	5 viales de 0,6 mL	
Antisuero Anti-Kappa – PER (listo para usar)	1 vial de12 mL	
Sustrato Kappa (listo para usar)	1 vial de 12 mL	
Solución Stop (lista para usar)	1 vial de 12 mL	

- Durante el transporte, el kit debe conservarse imperativamente entre 2-8 °C
- En el laboratorio, el kit debe almacenarse entre 2-8 °C
- Estabilidad del kit: 12 meses máximo

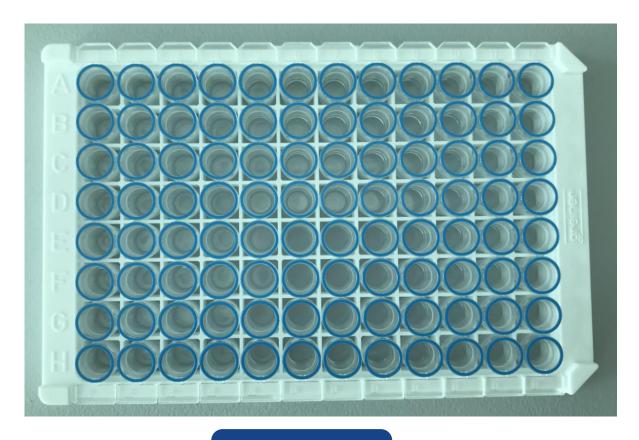
Kit FLC Lambda

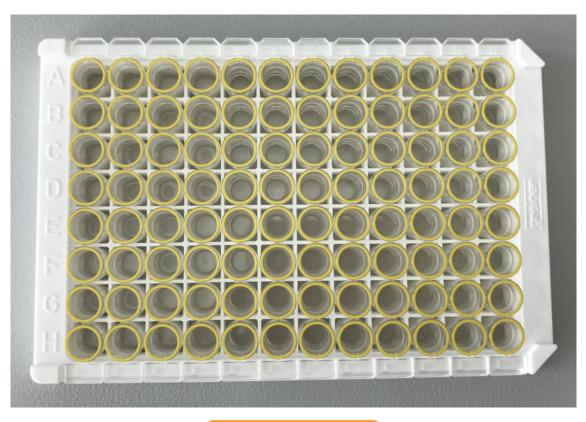


ITEMS	PN 5103
Microplaca Lambda (lista para usar)	1 microplaca de 12 segmentos con 8 pocillos cada uno
Tampón de dilución (listo para usar)	1 vial de 100 mL
Solución de lavado (solución concentrada)	1 vial de 100 mL
Calibradores Lambda (listos para usar)	5 viales de 0,6 mL
Antisuero Anti-Lambda – PER (listo para usar)	1 vial de12 mL
Sustrato Lambda (listo para usar)	1 vial de 12 mL
Solución Stop (lista para usar)	1 vial de 12 mL

- Durante el transporte, el kit debe conservarse imperativamente entre 2-8 °C
- En el laboratorio, el kit debe almacenarse entre 2-8 °C
- Estabilidad del kit: 12 meses máximo

Microplacas





Kappa

Lambda

Controles de calidad

Control FLC NIVEL 1

PN 5112 (x 1 vial)



Kappa & Lambda VALORES NORMALES

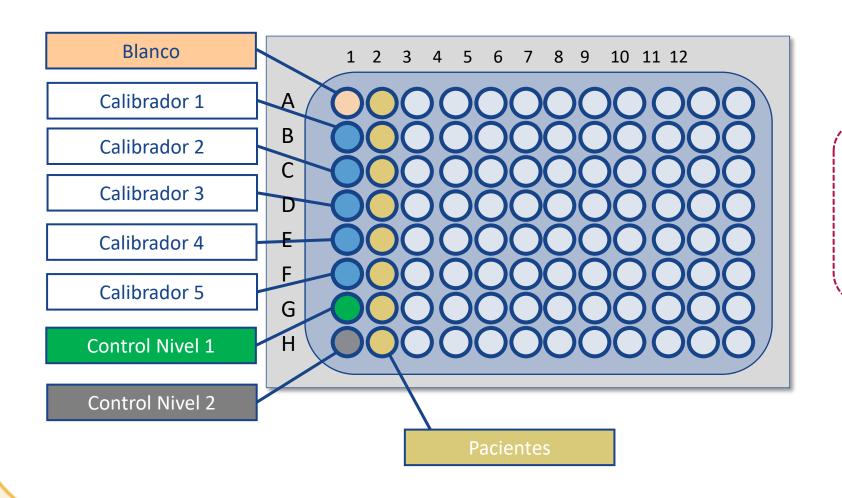
Control FLC NIVEL 2

PN 5113 (x 1 vial)



Kappa & Lambda VALORES ELEVADOS

Diseño de la microplaca



MICROPLACA 96 pocillos:

- 2 controles de calidad
- 88 pacientes

Muestras para el análisis

- Sueros frescos
- Almacenamiento:
- Entre 2-8°C → máximo de 14 días
- Entre $18 / 30 \, ^{\circ}\text{C} \rightarrow 4 \, \text{meses}$
- No congele y descongele un suero más de 5 veces
- No analizar:
- Muestras de plasma
- Muestra incorrectamente almacenadas, degradadas
- Dilución de las muestras y controles 1:1000 con el tampón de dilución



Criterios de validación de la microplaca

	KAPPA		LAN	MBDA	
Blanco	0,091		Blank	0,141	
CAL 1	0,213		CAL 1	0,293	
CAL 2	0,325		CAL 2	0,397	
CAL 3	0,744		CAL 3	0,725	
CAL 4	1,780		CAL 4	1,333	
CAL 5	2,729		CAL 5	1,963	

КАРРА		
ID	mg/L	
CTL L1	11,5	
CTL L2	30,1	

LAMBDA		
ID	mg/L	
CTL L1	18,0	
CTL L2	26,7	

Controles dentro del rango especificado en el inserto

- DO Blanco < 0.25
- DO Blanco < DO CAL 1

Valores de referencia

Kappa

4.9 - 13.7 mg/L

Lambda

 $7.6 - 19.5 \, \text{mg/L}$

Ratio k/λ

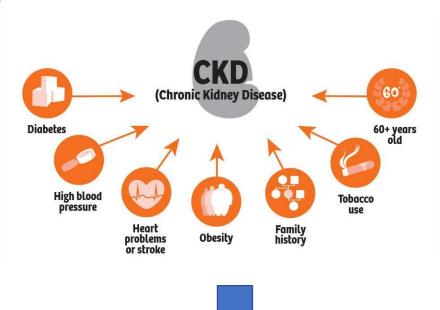
0,27 - 1,67





Enfermedad renal crónica

- En pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) que tienen una tasa de filtración glomerular reducida:
- el **clearence** renal de las CLL policionales **disminuye**
- y la [CLL] séricas aumentan
- Es por eso, que se estableció un rango de referencia extendido de la relación k/λ para estos pacientes:





Relación k/λ : 0,46 – 2,23

Realización de la técnica sebia FLC

ELISA manual

Instrumento ELISA automatizado AP22 ELITE (DAS)

Otros instrumentos ELISA automatizados

ELISA manual

Instrumentos & Accesorios

- Densitómetro por espectrofotometría de absorbancia a 450 nm
- Pipeta monoclonal (5, 100 y 1000 μL)
- Pipeta multicanal (100 y 300 μL)
- Reservorio para reactivos (10 y 30 mL)
- Microtubos
- Tips











AP22 ELITE (DAS)

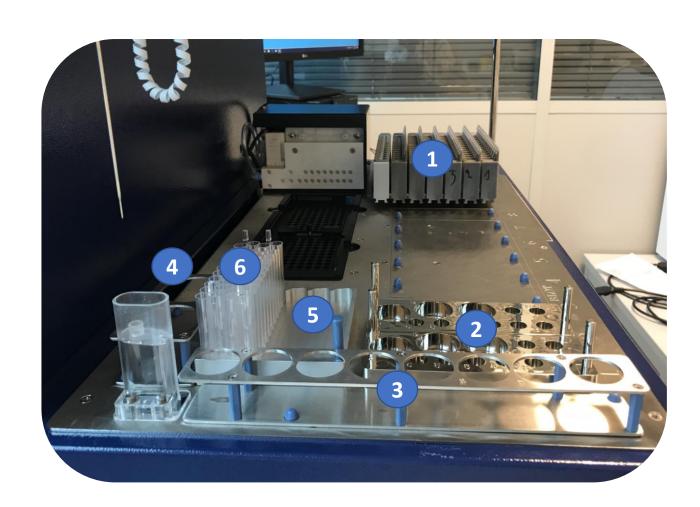
- Tamaño: 62 x 83 x 72h cm
- Lector de códigos de barras para muestras y racks de muestras
- Tanques de lavado y residuos con sensores de nivel
- Dilución de las muestras en bloques de dilución
- 1 aguja para dilución de muestras y dispensación de reactivos
- Lavador automático
- Lector de placa con filtro de 450 nm
- 2 microplacas en paralelo
- Capacidad de carga: 7 racks x 13 muestras (91 muestras)
- Volumen mínimo de muestra: 200 μL
- Mantenimiento diario muy simple
- Configuración B1 = hasta 55 muestras (2h 45min)
- Configuración C1 = hasta 90 muestras (3h 36min)



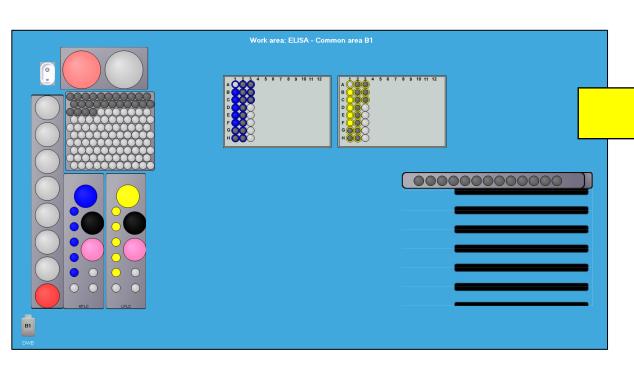


AP22 ELITE (DAS) — Área de trabajo

- 1 Racks de muestras
- 2 Racks de reactivos ELISA
- Rack de reactivos comunes
- 4 Rack para 2 diluyentes
- 5 Soporte para 5 bloques de dilución
- 6 Bloques de dilución

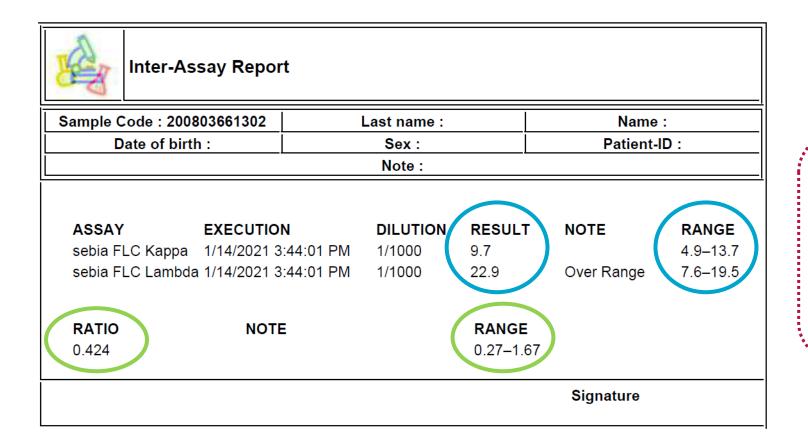


AP22 ELITE (DAS) — Área de trabajo





AP22 ELITE (DAS) — Reporte



- Cálculo automático de FLC Kappa y FLC Lambda (mg/L)
- Cálculo automático de la relación k/λ

Otros instrumentos ELISA automatizados





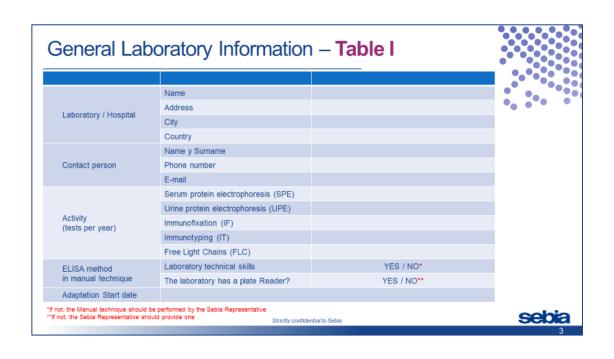


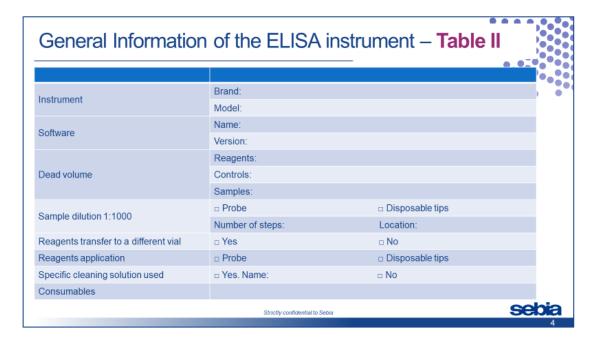






Adaptación de los **kits sebia FLC** a un instrumento ELISA automatizado





Adaptación de los **kits sebia FLC** a un instrumento ELISA automatizado



	STEP	DESCRIPTION
Sebia Ada	1) Concordance study	Comparison of the optical density (OD) and the FLC concentration, reported by Sebia FLC assays in manual technique with those obtained in automated technique
SEBIA FLC kits are on open platforms the laboratories' s regulations in forc only. • Name of the Lab	2) Analytical performance (of the automated ELISA platform)	Repeatability study analyzing 2 samples (of different concentrations) 30 times each, in both Kappa and Lambda assays
Laboratory addre Contact person(s	3) Carry-over analysis	Analysis of 2 samples (one with high FLC concentration (H), one with low FLC concentration (L)) alternating the H and L samples: L, L, H, H, L, H, H, L, L, H, H, H, L, H, H, H, L, H, H, H, L, H,





Características analíticas

sebia

The new language of life

Ventajas de los kits sebia FLC: Ausencia de exceso de antígeno

Received: 17 January 2019 | Accepted: 22 January 2019

DOI: 10.1002/ajh.25422

CORRESPONDENCE

Antigen excess pitfall for free light chains measurements solved by ELISA assay

TABLE 1 Serum free light chains measurement according to successive dilution performed on two different assays, Freelite (Immunoturbidimetry) and Sebia FLC (ELISA). Standard lambda Freelite (mg/L): 5.71-26.3; Standard lambda Sebia FLC (mg/L): 8.2-18.1; Standard kappa Freelite (mg/L): 3.3-19.4; Standard kappa Sebia FLC (mg/L): 5.2-15.4. Bold values correspond to final results

	Patient 1		Patient 2		Patient 3	
Dilutions	Lambda Freelite (mg/L)	Lambda Sebia FLC (mg/L)	Lambda Freelite (mg/L)	Lambda Sebia FLC (mg/L)	Kappa Freelite (mg/L)	Kappa Sebia FLC (mg/L)
1/10	131		159		<4.1	
1/1000	>16 800	>90	>16 800	>90	2630	>90
1/10 000	29 238	>900	57 922	>900		>900
1/100 000		1791		1138		3339

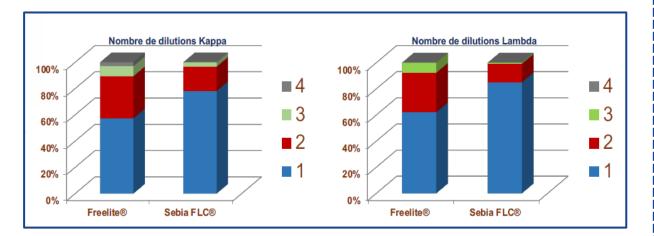
In conclusion, our report shows that the new sandwich ELISA Sebia FLC is a good alternative to SFLC assessment and can avoid the problem of antigen excess.

Ventajas de los kits sebia FLC: Baja tasa de re-análisis

Dosages des chaînes légères libres sériques :
Comparaison de méthode entre la technique Freelite® (The Binding Site) et Sebia FLC®

Jean-David PEKAR¹, Susanna SCHRAEN¹, Brigitte ONRAED¹

1. CHU de Lille, Laboratoire de Biochimie des protéines, 59000 Lille, France



In our prospective cohort, the Sebia FLC® needed significantly fewer dilutions than the Freelite® assay for both κ and λ measurements (p <0.001) (Figure 3).

DEVELOPMENT OF A NEW sFLC ELISA ASSAY FOR THE QUANTIFICATION
OF SERUM FREE LIGHT CHAINS

Bérangère GUILLAUME¹, Aurore VEY¹, Marie-Thérèse MELKI¹, Frédéric ROBERT¹ ¹Sebia, Lisses, France

% of rete	est Kappa	% of rete	st Lambda
Sebia	Nephelemetry*	Sebia	Nephelemetry*
9%	33%	8%	36%
Results consolidation done on 5 Laboratories ⇒ N = 1244 samples			

• At the standard dilution, sebia FLC has a measurement range 5 times broader that the average measurement range of the nephelometric/turbidimetric techniques on the market and this allows obtaining 3 to 4 times less out-of-range samples in a batch of analysis leading to significantly decreased reagents' consumption (Figure 3).

135

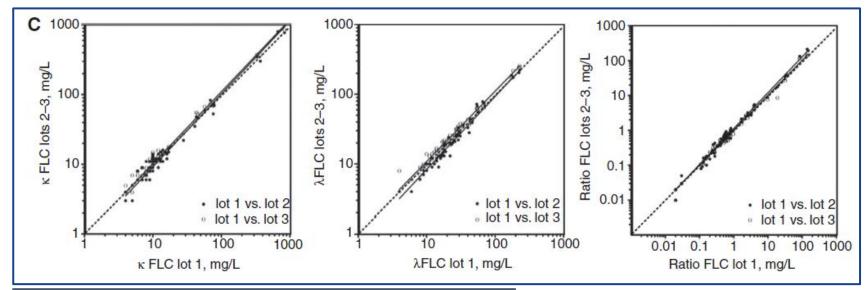
Ventajas de los kits sebia FLC: Consistencia lote a lote

DE GRUYTER

Clin Chem Lab Med 2017; aop

Joannes F.M. Jacobs*, Corrie M. de Kat Angelino, Huberdina M.L.M. Brouwers, Sandra A. Croockewit, Irma Joosten and Renate G. van der Molen

Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods



of polyclonal and monoclonal FLC (Figure 2C). The slopes of the Deming regression were within 1.006–1.097, with correlation coefficients (R) \geq 0.99. The mean normalized

differences between lots for κ FLC and λ FLC ranged from -4.3% to 2.7%.

Ventajas de los kits sebia FLC: Precision

DE GRUYTER

Clin Chem Lab Med 2017; aop

Joannes F.M. Jacobs*, Corrie M. de Kat Angelino, Huberdina M.L.M. Brouwers, Sandra A. Croockewit, Irma Joosten and Renate G. van der Molen

Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods

Table 2:	Reproducibility.

Sample	mg/L	Intra-assay CV% (n=20)	mg/L	Inter-assay CV% (n=7)
κFLC				
Polyclonal normal	8.2	7.6	9.8	1.9
Polyclonal high	32.7	7.5	24.7	7.6
Monoclonal κ-FLC_1	53.8	8.1		
Monoclonal κ-FLC_2	75.5	6.7		
λFLC				
Polyclonal normal	13.7	5.1	12.6	6.3
Polyclonal high	28.9	6.6	28.7	6.0
Monoclonal λ-FLC_1	54.7	8.1		
Monoclonal λ-FLC_2	65.1	7.1		

Accepted Manuscript

Evaluation of the new Sebia free light chain assay using the AP22 ELITE instrument



Laurence Lutteri, Marie-Claire Aldenhoff, Etienne Cavalier

We evaluated intra and inter-assay imprecision using negative and positive controls provided by Sebia. For kappa FLC, the CVs ranged from 3.3 to 7.7 % for intra-assay and 6.4 to 11.2 % for inter-assay and for lambda FLC, respectively from 9.6 to 10.1 % and from 7.3 to 12.2 %.

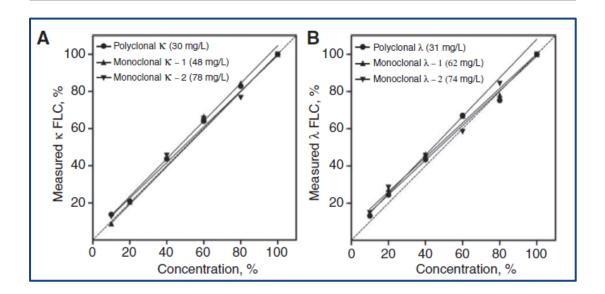
We also evaluated the inter-assay imprecision using six patients' samples with different concentrations of light chains. The CVs were between 5.8 and 14.6 % for kappa FLC and from 5.3 to 12.4 % for lambda FLC (supplemental Table 1).

Ventajas de los kits sebia FLC: Linearidad

DE GRUYTER Clin Chem Lab Med 2017; aop

Joannes F.M. Jacobs*, Corrie M. de Kat Angelino, Huberdina M.L.M. Brouwers, Sandra A. Croockewit, Irma Joosten and Renate G. van der Molen

Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods



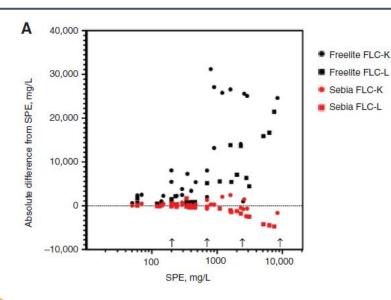
26]. Finally, because of the limited measurement range of current FLC assays, a serum sample with high FLC concentration needs to be re-assayed several times before producing a valid result within the analytical range [12]. Sebia FLC ELISA as a novel platform for sFLC analysis seems to overcome these analytical limitations as it shows good linearity and it is not affected by antigen excess. The good reproducibility and the lot-to-lot consistency of the Sebia FLC assay are further crucial requirements for long-term patient follow-up. In addition, due to the wide

Ventajas de los kits sebia FLC: Consistencia en la cuantificación del pico monoclonal en EPS

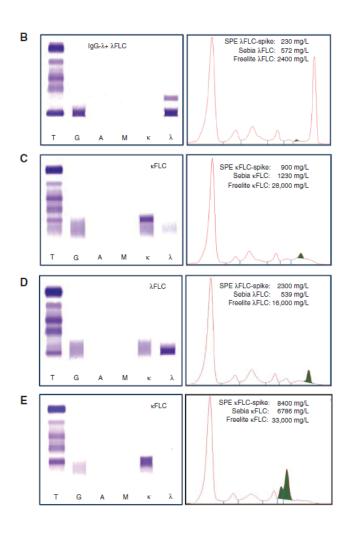
DE GRUYTER Clin Chem Lab Med 2017; aop

Joannes F.M. Jacobs*, Corrie M. de Kat Angelino, Huberdina M.L.M. Brouwers, Sandra A. Croockewit, Irma Joosten and Renate G. van der Molen

Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods



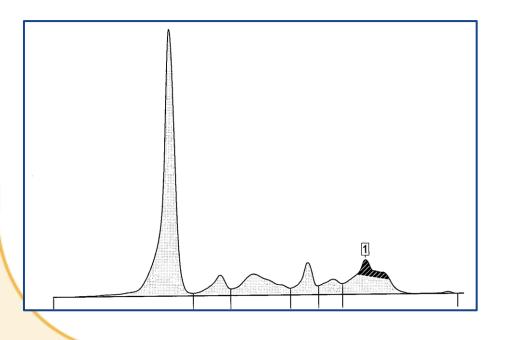
seen, particularly at higher FLC concentrations [22, 24]. It is demonstrated that both Freelite and N Latex nephelometric assays substantially overestimate the concentration of monoclonal FLC in samples with high titers, which is caused by FLC polymerisation [11, 22]. In this study we confirm these data, and demonstrate that the Freelite monoclonal FLC concentration was consistently, and on average 12-fold, overestimated compared to quantification by electrophoresis. In contrast, the monoclonal FLC



Ventajas de los kits sebia FLC: Consistencia en la cuantificación del pico monoclonal en EPS

DEVELOPMENT OF A NEW sFLC ELISA ASSAY FOR THE QUANTIFICATION OF SERUM FREE LIGHT CHAINS

Bérangère GUILLAUME¹, Aurore VEY¹, Marie-Thérèse MELKI¹, Frédéric ROBERT¹
¹Sebia, Lisses, France



SPE peak	Sebia FLC	Freelite
3200 mg/L	4817 mg/L	36400 mg/L

Figure 5. The Sebia FLC results are coherent with those obtained with the FLC peak quantification on SPE.

Sebia FLC kits: en resumen...

Rangos clínicos de referencia

- ✓ FLC Kappa
- √ FLC Lambda
- ✓ Relación k/λ
- ✓ Enfermedad crónica renal

Características analíticas

- ✓ Ausencia de exceso de antígeno
- ✓ Baja tasa de reanálisis
- ✓ Buena linealidad
- ✓ Preciso
- ✓ Baja variabilidad entre lotes





Especificaciones técnicas

- ✓ Automatización completa en AP22 ELITE
- ✓ Adaptable a otras plataformas de ELISA



Nieves SANZ Asesora Científica

Muchas Gracias por su atención

sebia

The new language of life