UMEÅ UNIVERSITET

BIOMEDICINSK
ANALYTIKERPROGRAMMET

Utvärdering av screeningmetod för monoklonala immunglobuliner i urin

Saga Engelmark

Examensarbete, 15 hp
Biomedicinsk analytikerprogrammet, 180 hp
VT 2024

Institutionen för Klinisk mikrobiologi
Biomedicinsk analytikerprogrammet

UMEÅ UNIVERSITET

Examensarbete, 15 hp
Kursansvarig: Urban Hellman
urban.hellman@umu.se

Examensarbetets engelska titel

Evaluation of a Screening Method for Monoclonal Immunoglobulins in Urine

Handledare

Kristina Stefansson, Institutionen för medicinsk biovetenskap, Umeå universitet

Läraropponent:	Maria Brohlin
Examinator:	Ylva Hedberg Fransson
Datum för godkännande:	2024-06-10

Abstrakt

Immunglobuliner är en typ av plasmaproteiner som normalt bidrar till kroppens immunförsvar. Vid onormal förökning av en plasmacellsklon utsöndras monoklonala immunglobuliner (M-komponenter). Multipelt myelom samt amyloidos orsakad av lätta immunglobinkedjor är sjukdomar som kan detekteras via screening för dessa M-komponenter. Screening utförs på serum eller urinprover via proteinelektrofores. Syftet var att utvärdera Sebia Hydragel 12 IF Penta vid screening av M-komponenter i jämförelse med laboratoriets rutinmetod. Materialet bestod av urinprover insamlat från 92 patienter. På alla urinprover genomfördes urinproteinelektrofores (UPE) med pentavalent immunfixation (IF Penta). Analyssvar för kvoten av fria lätta kedjor (FLC) erhölls från 70 serumprover. Efter UPE med IF Penta samt rutinmetod bedömdes 22 respektive 18 prover som positiva samt 70 respektive 73 prover som negativa för M-komponenter. Metoderna visade i 16 fall överensstämmande resultat. I sex fall kunde endast UPE med IF Penta påvisa M-komponenter och två fall detekterades M-komponenter endast via rutinmetoden. Via FLC kvoten bedömdes 25 serumprover positiva samt 45 negativa. Konklusionen var att vid screening för M-komponenter visades en signifikant skillnad mellan UPE med IF Penta och laboratoriets rutinmetod då fler antal M-komponenter påvisades av UPE med IF Penta vilket ger positiva indikationer till en mer känslig framtida analys.

Nyckelord

AL-amyloidos, FLC kvot, monoklonala immunglobuliner, multipelt myelom, pentavalent immunfixation, urinproteinelektrofores.

Introduktion

Serumproteinelektrofores (SPE) samt urinproteinelektrofores (UPE) används vid diagnostik av olika sjukdomar som påverkar plasmaceller (1). I kroppens immunförsvar medverkar plasmaceller genom att producera immunglobuliner, antikroppar. De producerade immunglobulinerna är specifika för olika antigener som återfinns på humana patogener (2). Monoklonala immunglobuliner (M-komponenter) är proteiner som utsöndras när det sker en onormal förökning av en monoklonal klon från plasmaceller (3). Koncentrationen av M-komponenter blir då nog hög för att påvisas med elektroforetisk analys (3, 4). Kompletta M-komponenter består av två tunga kedjor av gamma (γ), my (μ) eller alfa (α) variant samt två lätta kedjor av kappa (κ) eller lambda (λ) variant. Dessa bildar tillsammans immunglobulin G (IgG), immunglobulin M (IgM) eller immunglobulin A (IgA) (5). De M-komponenter som ej är kompletta består endast av fria lätta kedjor (FLC) (4) samt i sällsynta fall endast tunga kedjor (6).

Multipelt myelom (MM) är en plasmacellssjukdom i benmärgen som uppstår på grund av malignt förändrade plasmaceller (7). I benmärgen utgör normala plasmaceller en liten del av den totala mängden celler. Vid MM ökar de maligna plasmacellerna i mängd och utsöndrar M-komponenter i blodcirkulationen. När M-komponenterna utsöndras i blodcirkulationen kan de detekteras i serumprover via SPE (8). Screening av M-komponenter för att upptäcka MM kan även utföras med UPE på urinprover för att påvisa monoklonala lätta kedjor, som metoden främst används för (1, 4). Förekomsten av MM är vanligare hos äldre personer (8). Ofta är MM asymtomatiskt i tidigt stadie men indikationer på sjukdomen är smärtor i skelettet, trötthet som bland annat kan bero på anemi samt viktminskning (7, 9). Hyperviskositet som uppstår av hög utsöndring av M-komponenter i blodet kan leda till nedsatt njurfunktion (9). Tillståndet monoklonal gammopati av oklar signifikans (MGUS) är premalign ökning av plasmacellskloner (10). Sjukdomen MM kan med undantag utvecklas från MGUS samt asymtomatiskt multipelt myelom (11, 12). Att veta vilka patienter som utvecklar MM från MGUS är svårt. Storleken, typen av M-komponent, kvoten av mängden κ samt λ lätta kedjor (FLC kvot) (4) och mängden plasmaceller i benmärgen kan vara viktiga markörer för identifiering av patienter med högre risk. Storleken på M-komponenten har visats som en av de viktigaste markörerna att undersöka samt att M-komponenter av IgA typ ger större risk för utveckling av MM. För att konstatera MGUS bör SPE, immunfixation samt andra analyser som blodstatus och kontroll om proteiner förekommer i urinen utföras. Vid screening för asymtomatiskt multipelt myelom bör analys av blodstatus, SPE, immunfixation samt UPE med urin från en 24 tim samling utföras. Om en patient har under 10 % klonala plasmaceller i benmärgen, ett värde av M-komponenter i serum som underskrider 30 g/L samt är utan avgörande skador på organ kan de diagnostiseras med MGUS. Asymtomatiskt multipelt myelom diagnostiseras genom att andelen klonala plasmaceller i benmärgen är eller överstiger 10 % utan avgörande skador på organ eller ett M-komponentvärde, i serum, på 30 g/L eller mer. Att konstatera om patienten har MGUS eller asymtomatiskt multipelt myelom är av stor vikt då asymtomatiskt multipelt myelom oftare leder till MM (13).

Amyloidos orsakad av lätta immunglobulinkedjor (AL-amyloidos) är en sjukdom där kloner av plasmaceller producerar toxiska monoklonala FLC, av κ eller λ typ. Sjukdomen orsakar skada samt nedsatt funktion i påverkade organ (14). Mängden monoklonala FLC är ofta låg och då inte detekterbart av screeningmetoder som SPE (15). Symtomen vid AL-amyloidos som ofta är diffusa kan vara leverdysfunktion, nefrotiskt syndrom samt hjärtsvikt (16). De symtom som uppstår beror på det påverkade organet. Ofta upptäcks symtomen sent vilket kan försena diagnos. Detekterbara M-komponenter samt biomarkörer från organskador kan ses tidigt och underlätta diagnostiken (14, 17). Vid misstanke om AL-amyloidos bör FLC analys (18), immunfixation av serum samt urin utföras. En 24 tim samling av urin vid immunfixation är essentiell. Hög mängd λ lätta kedjor är en tydlig markör för AL-amyloidos (16).

Screening av olika plasmacellsjukdomar sker med olika metoder där effektiviteten av metoderna varierar (19). Proteinelektrofores, som SPE och UPE, används vid screening av M-komponenter i serum respektive urinprover. Proverna vandrar i ett elektriskt fält där proteinerna, i proverna, separeras beroende på elektrisk laddning samt storlek. De separerade proteinerna stannar i zoner. Första zonen är albuminzonen lodrät följt av två alfazoner, två betazoner samt en gammazon längst ner. I gammazonen finns normalt polyklonalt immunglobulin utspritt. Proteinelektrofores kan utföras via agarosgelelektrofores där proverna vandrar på en gelplatta och avtecknas som visuella band efter proteinfärgning. En onormal samling av proteiner framträder som ett extra band och kan tyda på M-komponenter i provet (4). Immunfixation utförs på prover där ett extraband syns för att säkerställa om M-komponenter av typerna IgG, IgA, IgM, κ eller λ FLC förekommer (4, 20). Metoden SPE visar hög klinisk sensitivitet samt specificitet och är essentiell vid screening av plasmacellssjukdomar. I kliniskt bruk används SPE som den initiala screeningmetoden samt i kombinationer med andra metoder som UPE samt FLC analys (21). Pentavalent immunfixation (IF Penta) kan användas som analysmetod vid screening av M-komponenter. I metoden utförs proteinelektrofores samt immunfixation med pentavalent antiserum under samma tillfälle på serumprover och analyssvar av IF Penta avläses visuellt. Proteinelektroforesen används som referens till tolkning samt bedömning av immunfixationen. För varje prov befinner sig immunfixationen bredvid proteinelektrofores referensen. Pentavalent antiserum innehåller antikroppar mot IgG, IgA, IgM, κ samt λ. Vid analys endast med proteinelektrofores finns risken att M-komponenter ej detekteras då de kan gömmas bakom andra proteiner (22). Användning av pentavalent antiserum kan minska den risken (23).

Syftet med studien var att utvärdera Hydragel 12 IF Penta som analysmetod vid screening av monoklonala immunglobuliner i urin i jämförelse med laboratoriets rutinmetod.

Material och metoder

Urinprover

Materialet bestod av urinprover från patienter som undersöktes för potentiella M-komponenter i urin insamlat på Norrlands Universitetssjukhus. I studien ingick prover från totalt 92 patienter varav 42 hade tidigare kända M-komponenter och 50 saknade M-komponenter. Av det totala antalet patienter var 37 (40 %) kvinnor och 55 (60 %) var män. Medianåldern för alla patienter var 68 år. Urinproverna analyserades via laboratoriets rutinmetod samt denna studies kliniska utvecklingsmetod.

Laboratoriets rutinmetod för urinproteinelektrofores

Utförandet av metoden gjordes enligt laboratoriets anvisningar som var baserade på instruktioner från tillverkaren (Sebia, Lisses, Frankrike). Urinprover som ej var koncentrerade samt en kontroll bestående av serum utan M-komponent applicerades i en applikator som sedan inkuberades i en fuktkammare. Kittet Hydragel 15 B1-B2 (Sebia) användes vid analys av urinproverna. Kittet monterades på instrumentet Hydrasys 2 Scan Focusing (Sebia) följt av applicering av applikatorn med urinproverna. Därefter utfördes UPE via programmet Unconc Urine. Infärgning av urinproverna utfördes med färgprogrammet HR Acid Violet på samma instrument som UPE. Resultatet av proteinmönstret bedömdes visuellt av en läkare som även avgjorde om immunfixation behövde utföras som ytterligare analys. Vid immunfixation användes instrumentet Hydrasys 2 Scan Focusing (Sebia) med Hydragel 4 IF kit (Sebia).

Urinproteinelektrofores med pentavalent immunfixation

Samtliga urinprov koncentrerades i Amicon Ultra 0,5 ml centrifug filter (UFC500396, Merck Millipore, Burlington, MA) med tre kilodalton molekylvikts separering på centrifugen Fresco 21 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Urinproverna centrifugerades i två omgångar vid 14 000 g i 15 min och koncentrerades då sju gånger med totalt 950 µl urin från varje prov. En kontroll tillverkad av serum utan M-komponent och natriumklorid applicerades i första position på applikatorer följt av de koncentrerade urinproverna applicerade som dubbelprov. Applikatorerna placerades i en fuktkammare i minst fem min. Kittet Hydragel 12 IF Penta (4342, Sebia) monterades på instrumentet Hydrasys 2 Scan Focusing (Sebia) och sedan följdes anpassat program 6/12 Penta SM/DM vid UPE. Pentavalent antiserum samt fixativ lösning (4345, Sebia) applicerades under UPE med en dynamisk mask (Sebia). Efter UPE färgades urinproverna på samma instrument med färgprogrammet HR Acid Violet. Förutom val av färgprogram utfördes appliceringen av de koncentrerade urinproverna samt efterföljande moment enligt tillverkarens instruktioner (22). Resultatet bedömdes visuellt av läkare med kompetensbevis för UPE bedömning.

Kvoten av fria lätta kedjor

Analys av FLC kvoten var utförd på serumprover. Analyssvar erhölls från Atellica NEPH 630 (Siemens Healthineers, Erlanger, Tyskland). Prover vars värden befann sig utanför referensintervallet 0,31-1,56 bedömdes positiva för M-komponenter.

Statistik

För att avgöra om det fanns signifikant skillnad mellan rutinmetoden samt UPE med IF Penta vid screening av M-komponenter användes Pearson's Chi^2 test. Signifikansnivån bestämdes vara 5 % vilket medförde att ett *p*-värde under 0,05 bedömdes signifikant. Statistiska beräkningar som signifikanstest samt konfidensintervall utfördes med Jamovi version 2.3.28.0. Konfidensnivån var 95 %.

Etiska överväganden

Ingående patienter förutsattes vara informerade om att prov för UPE analyserats samt undersökningens syfte. Ett kliniskt utvecklingsarbete innehållande UPE utfördes och jämfördes med laboratoriets rutinmetod. Ingen annan information än laboratoriets rutinmetod och inget provmaterial sparades vid det kliniska utvecklingsarbetet, därför bedömdes patienterna ej behöva tillfrågas ytterligare om samtycke. Det kliniska utvecklingsarbetet kunde potentiellt ha högre känslighet än rutinmetoden vilket kunde medföra ett etiskt dilemma. Med högre känslighet menades detektera lägre nivåer av M-komponenter. Om det kliniska utvecklingsarbetet detekterade M-komponenter som inte påvisades med rutinmetoden utfördes bekräftande underökningar med immunfixation enligt laboratoriets arbetssätt. Patientproverna var avidentifierade och kunde ej kopplas till personuppgifter utan särskild tillgång till laboratoriets IT-system. Arbetet bedömdes ej behöva etiskt tillstånd för utförandet.

Resultat

Detekterade M-komponenter i prover via rutinmetod, UPE med IF Penta samt FLC kvot inklusive uppmätta värden

Totalt analyserades 92 urinprover från patienter med rutinmetoden samt UPE med IF Penta. Med metoden UPE med IF Penta bedömdes 22 av urinproverna vara positiva för M-komponenter. Av de 22 patienter med positiva urinprover hade 18 av patienterna sedan tidigare en påvisad M-komponent vid något tillfälle. Metoden bedömde 70 urinprover som negativa för M-komponenter. Metoden UPE med IF Penta samt rutinmetoden detekterade M-komponenter i fyra urinprover där patienterna ej hade tidigare känd M-komponent. Rutinmetoden bedömde 18 urinprover som positiva för M-komponenter. Av dessa 18 urinprover detekterade rutinmetoden 14 urinprover från patienter med tidigare känd M-komponent. Totalt bedömdes 73 av 92 urinprover som negativa för M-komponenter med rutinmetoden. Statistisk signifikant skillnad vid antal påvisade M-komponenter visades mellan rutinmetoden samt UPE med IF Penta, p <0,001. Via FLC kvoten var det 25 serumprover som bedömdes positiva samt 45 som bedömdes negativa av totalt 70 prover. Av de 25 positiva serumproverna hade 21 av dessa tidigare påvisad M-komponent (Tab. 1).

Av totalt 70 prover överensstämde UPE med IF Penta samt FLC kvoten för 17 prover. Fyra M-komponenter bedömdes positiva av UPE med IF Penta där FLC kvoten bedömt dem negativa. Det var åtta prover där FLC kvoten påvisat M-komponenter som UPE med IF Penta ej påvisat. Kvoten av FLC samt rutinmetoden överensstämde för 15 prover. Rutinmetoden bedömde två prover positiva där FLC kvoten ej överensstämde. Det påvisades 10 prover innehållande M-komponenter via FLC kvoten som ej påvisades via rutinmetoden (Tab. 2). Rutinmetoden samt UPE med IF Penta visade överensstämmande resultat för 16 urinprover. Det var sex prover som UPE med IF Penta påvisade M-komponenter i där rutinmetoden ej gjorde det. Rutinmetoden påvisade M-komponenter i två prover som UPE med IF Penta missade. Kvoten av FLC, UPE med IF Penta samt rutinmetoden påvisade M-komponent överensstämmande för 14 av 70 urin eller serum prover. Av dessa 70 prover bedömde endast UPE med IF Penta tre urinprover, rutinmetoden ett urinprov samt FLC kvoten sju serumprover som positiva för M-komponenter (Tab. 3).

Av de M-komponenter som detekterades i urinproverna var två IgG κ, en IgG λ, 12 endast κ samt tre endast λ typ. Mängden U-protein i de 92 urinproverna beräknades till ett medelvärde på 662 mg/L samt ett medelvärde för κ / λ kvot på 30 vilket ej förhöll sig inom referensintervallet (Tab. 4).

Visuellt resultat av UPE med IF Penta

Samtliga 92 urinprover som screenades och gav visuella resultat. Efter UPE med IF Penta utförts sågs ej några tydliga band varken vid UPE referensen eller IF Penta screeningen för de utvalda exemplen A1, A2 samt A3. Detta bedömdes som att M-komponenter ej detekterats (Fig. 1A). För exemplen B1, B2 samt B3 sågs ett synligt band både vid UPE referensen samt IF Penta screening för varje exempel. Detta bedömdes som att M-komponent påvisats i urinproven (Fig. 1B).

Diskussion

Denna studie utfördes för att potentiellt utveckla nuvarande klinisk rutinmetod samt bedöma möjligheten för metoden IF Penta att användas på urinprover och via det ge mer pålitlig screening av M-komponenter. Enligt tillverkaren Sebia beskrivs IF Penta som en metod där serumprover används som analysmaterial för screeningen av M-komponenter och ej urinprover (22). Det har utvärderats om IF Penta kan användas som ytterligare screeningtest av M-komponenter i urinprov. Resultatet av den utvärderande studien visade att användning av IF Penta för urinprover vid screening av M-komponenter är en möjlighet. Det visades även att IF Penta är känsligare vid detektion av M-komponenter i jämförelse med högupplöst UPE (24). En mer pålitlig metod och känsligare metod är önskvärd för detektion för svårbedömda fall där de M-komponenter som utsöndras är FLC, som vid AL-amyloidos. I 20 % av personer med MM är FLC de enda M-komponenter som kan detekteras (25) vilken talar för att en utveckling av en känsligare metod som exempelvis UPE med IF Penta är behövd.

Metoden UPE med IF Penta påvisade M-komponenter i fler urinprover jämfört med laboratoriets rutinmetod. Liknande resultat framkom i båda metoderna men UPE med IF Penta var mer känslig och påvisade fler M-komponenter än rutinmetoden. Intressant var att även motsatsen kunde ses. Prover som bedömts positiva endast för UPE med IF Penta teoretiseras bero på visuellt tydligare band samt att metoden lättare detekterade prover med ursprunglig låg proteinmängd. Detta efter att proverna koncentrerats. Vid de fall rutinmetoden påvisade M-komponenter men ej UPE med IF Penta spekuleras bero på att rutinmetoden är utvecklad för urinprover men ej IF Penta vilket lett till missade M-komponenter. En ytterligare anledning kan vara felbedömningar då andra proteinband i urinen felaktigt bedömts som M-komponenter. Efter behandling kan mängden utsöndrade M-komponenter i urinen minska. Detta kan ses som anledningen till att urinprover bedömts negativa från patienter med tidigare kända M-komponenter. Denna studies resultat var överensstämmande med en tidigare studie som även den visade att IF Penta är en känsligare screeningmetod i jämförelse med endast UPE vid detektion av M-komponenter i urin (24).

Rutinmetoden samt UPE med IF Penta påvisade sex respektive fyra färre M-komponenter i jämförelse med FLC kvoten. Tidigare studier har visat att FLC analys av serum är en känsligare screeningmetod i jämförelse med UPE för detektion av M-komponenter (21). Detta kan ses som anledningen till att FLC kvoten givit fler positiva svar i jämförelse med metoderna innehållande UPE i denna studie. Analyssvar av FLC kvot utanför referensvärdena tyder starkt på monoklonal produktion av κ samt λ kedjor (4). Detta är av klinisk relevans för användning av FLC analys som en kompletterande metod till proteinelektrofores. Om FLC kvoten hade analyserats i fler prover kan det teoriseras att fler M-komponenter som eventuellt gått missade av UPE metoderna kunnat påvisas med FLC kvoten.

Vanligaste M-komponenten vid screening sågs vara endast fri κ då den utgjorde mer än hälften av de detekterade M-komponenterna. Medelvärdet av U-protein låg utanför referensintervallet. En översikt av alla resultat visade också att U-proteinvärden ofta förhöll sig högre än referensintervallet. Stor mängd proteiner i urinen kan tyda på problem med njurarna (26). Medelvärdet av FLC kvoten visade förhålla sig utanför referensintervallet men prover inom referensintervallet fanns flertalet av. Av de

värden som visades förhålla sig utanför referensintervallet låg majoriteten högre än referensintervallet. Medelvärdena för både U-protein samt FLC kvoten kan visats höga då värden varierade mycket från varandra.

Visuell bedömning av proteinelektrofores används i olika studier (27, 28) och är essentiell vid tidig diagnostik (28), men visuell bedömning kan orsaka problem som är betydande för resultatet. Vid rutinmetoden är proverna inte koncentrerade vilket kan medföra att band från M-komponenter ej syns på grund av för låg mängd i provet. Detta kan även ses som en anledning till ej detekterade M-komponenter för rutinmetoden i denna studie. När visuell bedömning av resultaten vid rutinmetoden ger antydan på M-komponent utförs immunfixation på valda urinprover Detta innebär att proverna koncentreras och bandtydligheten ökar. Vid IF Penta i denna studie utförs koncentrering av urinproverna direkt och ger då tydligare band med säkrare visuell bedömning för både UPE referensen samt immunfixationen. Den visuella bedömningen av rutinmetoden kan medföra problem vid de fall där uppföljande immunfixation ej rekommenderas. Detta då urinprover innehållande M-komponenter även här riskeras att ej upptäckas om M-komponenterna inte sågs vid initial UPE. Immunfixation ingår i metoden IF Penta och således minskar risken att M-komponenter missas på grund av utesluten immunfixation. Metoden IF Penta kan vara viktig vid screening och diagnostik av plasmacellssjukdomar av just denna anledning samt den ökade känsligheten vid användning av pentavalent antiserum. Detta har möjligheten att leda till säkrare diagnos för patienter. Om IF Penta på urinprover utvecklas ytterligare kan processen innebära snabbare resultat i jämförelse med de fall där UPE samt efterföljande immunfixation beställs. Detta kan ha betydelse för tidigare svar av eventuell diagnos samt uppföljning av sjukdom för patienterna.

Vid analys på prover före koncentrering kunde inga M-komponenter identifieras och därför utfördes koncentrering. Anledning till utbyte av färg från Amido black vilket var företagets rekommendationer till Acid violet följde samma anledning som för koncentreringen. En förklaring till att Amido black ej gav bedömbart resultat kan bero på att rekommendationen från tillverkaren baseras på användning av serumprover vilket ej användes i denna studie. Efter byte av färg samt val att koncentrera proverna kunde ett synligt och bedömbart resultat ses. Detta underlättade den visuella bedömningen och genom det kunde en säkrare bedömning av påvisade M-komponenter göras. Stor skillnad visades mellan positiva samt negativa resultat vilket minskade risken för felbedömning. Låg bandtydlighet sågs hos en del resultat vilket kan bero på mängden protein i urinprovet.

Vidare utveckling av denna studie kan vara att inkludera ett större antal prover och patienter. Detta ger större urval samt möjligheten att följa patienter under en längre tid för att bedöma hur pålitlig metoden är på sikt. Bedömningen av samma resultat kan utföras av flera läkare för att se likheter och skillnader i bedömning. Detta då den visuella bedömningen avgör om urinproverna bedöms positiv för M-komponenter eller ej samt om immunfixation ska utföras vid rutinmetod, vilket är beroende på vad enskilda läkare ser. För bedömning av metoderna på en mer likvärdig nivå hade immunfixation behövts utföras på alla urinprover i rutinmetoden. Resultatet från detta hade varit intressanta att jämföra med UPE med IF Penta resultaten men det hade inneburit överarbete för personalen samt

varit väldigt tids och kostnadskrävande. Metoden IF Penta kan därför underlätta även för personalen i aspekten av tid samt arbete.

Konklusion var att signifikant skillnad sågs mellan UPE med IF Penta samt laboratoriets rutinmetod då UPE med IF Penta påvisade fler M-komponenter vid screening, vilket ger positiva indikationer för framtida kliniska användningar av en känsligare analys.

Tack tillägnas

Jag vill tacka Kristina Stefansson och Göran Brattsand för bra samt informativ handledning under de teoretiska momenten och Helene Sandstedt för väldigt bra handledning vid de laborativa momenten i denna studie.

Referenser

1. Jenkins MA. Serum and urine electrophoresis for detection and identification of monoclonal proteins. Clin Biochem Rev. 2009;30(3):119-122.

2. Jackson DA, Elsawa SF. Factors regulating immunoglobulin production by normal and disease-associated plasma cells. Biomolecules. 2015;5(1):20-40. doi: 10.3390/biom5010020.

3. Bird J, Behrens J, Westin J, et al. UK Myeloma Forum (UKMF) and Nordic Myeloma Study Group (NMSG): guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). Br J Haematol. 2009;147(1):22-42. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07807.x.

4. Internetmedicin. Proteinelektrofores och fria lätta kedjor (FLC). https://www.internetmedicin.se/klinisk-kemi/proteinelektrofores-och-fria-latta-kedjor-flc (2024-04-19)

5. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Schlomchik MJ (2001) Immunobiology, 5th edition. Garland Science, ISBN: 9780815336426

6. Dash NR, Mohanty B. Multiple myeloma: a case of atypical presentation on protein electrophoresis. Indian J Clin Biochem. 2012;27(1):100-102. doi: 10.1007/s12291-011-0178-3.

7. Internetmedicin. Myelom (multipelt myelom, myelomatos). https://www.internetmedicin.se/hematologi/myelom-multipelt-myelom-myelomatos (2024-04-05)

8. Tripathy S. The role of serum protein electrophoresis in the detection of multiple myeloma: an experience of a corporate hospital. J Clin Diagn Res. 2012;6(9):1458-1461. doi: 10.7860/JCDR/2012/4213.2532.

9. Ramaiah KK, Joshi V, Thayi SR, Sathyanarayana P, Patil P, Ahmed Z. Multiple myeloma presenting with a maxillary lesion as the first sign. Imaging Sci Dent. 2015;45(1):55-60. doi: 10.5624/isd.2015.45.1.55.

10. Mouhieddine TH, Weeks LD, Ghobrial IM. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood. 2019;133(23):2484-2494. doi: 10.1182/blood.2019846782.

11. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood. 2009;113(22):5412-5417. doi: 10.1182/blood-2008-12-194241.

12. Lasocki A, Gaillard F, Harrison SJ. Multiple myeloma of the spine. Neuroradiol J. 2017;30(3):259-268. doi: 10.1177/1971400917699426.

13. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. Leukemia. 2010;24(6):1121-1127. doi: 10.1038/leu.2010.60.

14. Palladini G, Milani P, Merlini G. Management of AL amyloidosis in 2020. Blood. 2020;136(23):2620-2627. doi: 10.1182/blood.2020006913.

15. Jenner E. Serum free light chains in clinical laboratory diagnostics. Clin Chim Acta. 2014;1(427):15-20. doi: 10.1016/j.cca.2013.08.018.

16. Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2020 update on diagnosis, prognosis, and treatment. Am J Hematol. 2020;95(7):848-860. doi: 10.1002/ajh.25819.

17. Weiss BM, Hebreo J, Cordaro DV, Roschewski MJ, Baker TP, Abbott KC, Olson SW. Increased serum free light chains precede the presentation of immunoglobulin light chain amyloidosis. J Clin Oncol. 2014;32(25):2699-2704. doi: 10.1200/JCO.2013.50.0892.

18. Shaheen SP, Levinson SS. Serum free light chain analysis may miss monoclonal light chains that urine immunofixation electrophoreses would detect. Clin Chim Acta. 2009;406(1-2):162-166. doi: 10.1016/j.cca.2009.04.024.

19. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. Clin Chem. 2009;55(8):1517-1522. doi: 10.1373/clinchem.2009.126664

20. Misra A, Mishra J, Chandramohan J, et al. Old but Still Relevant: High Resolution Electrophoresis and Immunofixation in Multiple Myeloma. Indian J Hematol Blood Transfus. 2016;32(1):10-17. doi: 10.1007/s12288-015-0605-3.

21. McTaggart MP, Lindsay J, Kearney EM. Replacing urine protein electrophoresis with serum free light chain analysis as a first-line test for detecting plasma cell disorders offers increased diagnostic accuracy and potential health benefit to patients. Am J Clin Pathol. 2013;140(6):890-897. doi: 10.1309/AJCP25IHYLEWCAHJ

22. Yumpu. Sebia HYDRAGEL 6 IF Penta HYDRAGEL 12 IF Penta. https://www.yumpu.com/en/document/view/54298523/hydragel-6-if-penta-hydragel-12-if-penta (2024-04-19)

23. Malik S, Lee FJ, Katakouzinos K, Dermatis V, Gallagher K. The role of routine pentavalent screening immunofixation with serum electrophoresis: A retrospective cost-benefit analysis. Pathology. 2019;51(1):131. doi: 10.1016/j.pathol.2018.12.379

24. Basile U, Gulli F, Torti E, et al. Evaluation of screening method for Bence Jones protein analysis. Clin Chem Lab Med. 2016;54(11):e331-e333. doi: 10.1515/cclm-2015-1239.

25. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. Mayo Clin Proc. 2003;78(1):21-33. doi: 10.4065/78.1.21.

26. Bokenkamp A. Proteinuria-take a closer look! Pediatr Nephrol. 2020;35(4):533-541. doi: 10.1007/s00467-019-04454-w.

27. Salkie ML. A retrospective study of the relative utility of electrophoresis, immunoelectrophoresis, immunofixation, and nephelometry in the investigation of serum proteins. Clin Biochem. 1996;29(1):39-42. doi: 10.1016/0009-9120(95)02002-0.

28. Jaskowski TD, Litwin CM, Hill HR. Detection of kappa and lambda light chain monoclonal proteins in human serum: automated immunoassay versus immunofixation electrophoresis. Clin Vaccine Immunol. 2006;13(2):277-280. doi: 10.1128/CVI.13.2.277-280.2006.

Tabell 1. Förekomsten av M-komponenter i urin samt serumprover analyserat med olika screeningmetoder. Totalt antal patienter var 92, där 42 hade tidigare kända M-komponenter. Urinproteinelektrofores (UPE) med pentavalent immunfixation (IF Penta) bedömdes visuellt. Beräknat *p*-värde, mellan rutinmetod och UPE med IF Penta, var <0,001 med signifikansnivån 5 %.

Metod	Detekterad M-komponent (n)	Ej detekterad M-komponent (n)	Känd M-komponent [a] (n)	Ej känd M-komponent [b] (n)
UPE med IF Penta	22	70	18	4
Rutinmetod	18	73[c]	14	4
FLC kvot [d]	25	45	21	4

[a] Detektion av en M-komponent där patienten hade en tidigare känd M-komponent. Ingår i totalt antal detekterade M-komponenter för metoden.

[b] Detektion av en M-komponent där patienten ej hade en tidigare känd M-komponent. Ingår i totalt antal detekterade M-komponenter för metoden.

[c] Ett provsvar ej analyserat

[d] Analys ej utfört på alla prover. Värden utanför referensintervallet 0,31-1,56 tyder på M-komponenter

Tabell 2. Jämförelse över antal detekterade M-komponenter mellan urinproteinelektrofores (UPE) med pentavalent immunfixation (IF Penta), laboratoriets rutinmetod samt fria lätta kedjor (FLC) kvot. Totalt antal patientprover var (n=70).

	IF Penta		Rutinmetod	
FLC kvot	Detekterad M-komponent (n)	Ej detekterad M-komponent (n)	Detekterad M-komponent (n)	Ej detekterad M-komponent (n)
Detekterad M-komponent [a] (n)	17	8	15	10
Ej detekterad M-komponent [b] (n)	4	41	2	43
Total (n)	21	49	17	53

[a] Totalt antal var (n=25)

[b] Totalt antal var (n=45). Värden utanför referensintervallet 0,31-1,56 tyder på M-komponenter

Tabell 3. Överensstämmelse samt skillnad i antal påvisade M-komponenter i urin och serumprover mellan urinproteinelektrofores (UPE) med pentavalent immunfixation (IF Penta), laboratoriets rutinmetod samt fria lätta kedjor (FLC) kvot.

Påvisad M-komponent	Alla metoderna	Endast UPE med IF Penta	Endast Rutinmetod	Endast FLC kvot [c]
Antal (n) [a]	16	6	2	-
Antal (n) [b]	14	3	1	7

[a] Totalt antal urinprover (n=92). Jämfört mellan UPE med IF Penta och laboratoriets rutinmetod

[b] Totalt antal urin samt serumprover (n=70)

[c] Värden utanför referensintervallet 0,31-1,56 tyder på M-komponenter i serumprov

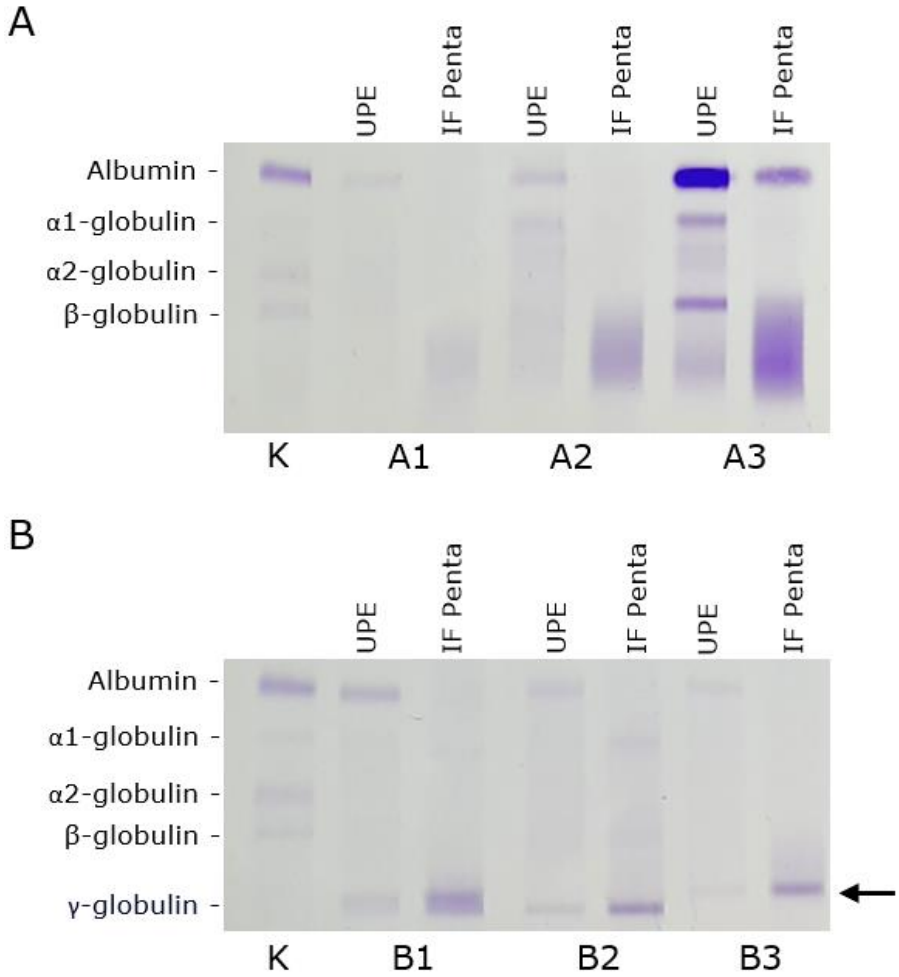
Tabell 4. Uppmätta värden samt upptäckta varianter av M-komponenter efter urinproteinelektrofores samt immunfixation i urinprover. Totalt 92 patienter ingick i hela studien. Konfidensnivån var 95 %.

	U-protein [ac] (mg/L)	FLC kvot [bc]	IgG κ (n)	IgG λ (n)	Endast κ (n)	Endast λ (n)
	662	30	2	1	12	3
Konfidensintervall	427–898	-7–69				

[a] Analyssvar erhölls från Cobas Pro c503 (Roche diagnostics, Basel, Schweiz). Referensintervall för U-protein är <150 mg/L.

[b] Referensintervall för FLC kvot är 0,31-1,56.

[c] Medelvärde av prover där provsvar angetts



Figur 1. Screening av M-komponenter i koncentrerade urinprover med metoden urinprotein-elektrofores (UPE) med pentavalent immunfixation (IF Penta). Urinprover samt kontroll (K) infärgat med Acid violet. För bedömning av IF Penta användes tillhörande UPE som referens. Förekomst av M-komponenter i utvalda prover A) A1 till A3 detekterades ej samt B) detekterades i B1 till B3 och sågs visuellt som band vid IF Penta.