



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica - DISIT

**Corso di Laurea Magistrale in Biologia**

TESI DI LAUREA

**Gammopatie monoclonali: dal laboratorio alla diagnosi**

**Candidato:**

Salvatore Gismondo

**Relatore:**

Professoressa Valentina Audrito

Stage svolto presso **Medical Srl**

**Tutor esterno:** Gianmaria Cabrini

Anno accademico 2023-2024

## Sommario

Scopo dello stage .....	4
Introduzione.....	6
Proteine plasmatiche.....	6
Cosa sono le immunoglobuline (anticorpi) .....	6
Struttura .....	7
IgG .....	10
IgA .....	10
IgM.....	10
IgD .....	11
Antigeni .....	11
Crioglobuline .....	12
Le gammopatie monoclonali .....	13
Gammopatia monoclonale di incerto significato - MGUS.....	13
Mieloma multiplo .....	17
Macroglobulinemia di Waldenström .....	18
Cirrosi epatica – Ponte beta- gamma.....	19
Ipogammaglobulinemia .....	20
Gammopatia policlonale .....	20
Plasmocitoma solitario.....	21
Sintomi.....	21
Diagnosi .....	22
Terapia .....	25
Tecniche biochimiche e immunochemiche per la diagnosi delle gammopatie monoclonali .....	29

Elettroforesi .....	29
Elettroforesi capillare.....	33
Composizione del tracciato elettroforetico .....	36
Quantificazione della componente monoclonale.....	44
Immunofissazione .....	44
Bence Jones Ouchterlony.....	46
Materiali e metodi.....	53
Quesiti di ricerca.....	55
Strategia di ricerca .....	55
Analisi statistiche.....	56
Risultati.....	57
Statistiche generali sulla popolazione dello studio.....	57
Esempi di tracciati elettroforetici della coorte.....	69
Caso clinico di progressione a livello della zona gamma.....	71
Fattori di rischio nelle gammopatie monoclonali.....	74
Tipologia di immunoglobulina .....	74
Dimensione della proteina monoclonale .....	75
Rapporto delle catene leggere libere.....	75
Discussione .....	76
Criteri di refertazione dei test .....	76
Limiti e punti di forza dello studio .....	78
Confronto con altri studi .....	79
Conclusioni .....	80
Bibliografia.....	82

## **Scopo dello stage**

Lo scopo dello stage è stato l'apprendimento del funzionamento di un laboratorio di analisi cliniche, compresi tutti i suoi settori e sistemi, tra cui il sistema informatico e il controllo di qualità.

Le attività pianificate hanno compreso sia formazione teorica che pratica in tutti i principali settori del laboratorio, tra cui: ematologia, coagulazione, elettroforesi capillare, microbiologia, chimica clinica ed immunologia.

In particolare è stata dedicata una notevole attenzione alla tecnica dell'**elettroforesi capillare**, con l'obiettivo di acquisire in modo critico dati utili per la tesi di ricerca sperimentale.

Il tirocinio è stato svolto presso il laboratorio analisi **Medical Srl** di Alessandria.

In questa sede si eseguono esami ematochimici e batteriologici in regime privatistico.

Lo scopo del presente studio è quello di fornire una panoramica esaustiva sulle **gammopatie monoclonali**, esaminando le loro caratteristiche essenziali, i meccanismi patogenetici sottostanti e le implicazioni cliniche. Sarà dedicata particolare attenzione alle **basi molecolari** della produzione e della regolazione delle immunoglobuline, nonché ai processi che conducono **alla monoclonalità delle cellule plasmatiche**.

Attraverso un'analisi dettagliata della fisiopatologia delle gammopatie monoclonali, saranno esplorati i principali fattori di rischio, i sintomi clinici e le complicanze associate a queste patologie.

Si approfondiranno inoltre le recenti scoperte nel campo della diagnosi, del monitoraggio e delle strategie terapeutiche.

Lo scopo ultimo di questo studio è offrire una visione completa delle gammopatie monoclonali, fornendo una base solida per la comprensione delle loro **implicazioni biologiche e cliniche**.

Attraverso un'analisi critica della letteratura scientifica e delle prospettive future, si auspica di contribuire allo sviluppo di nuove strategie diagnostiche e terapeutiche per migliorare la gestione e la prognosi di queste complesse patologie.

## **Introduzione**

Le **gammopatie monoclonali** sono un insieme di **disturbi ematologici** caratterizzati dalla proliferazione clonale di cellule plasmatiche che producono immunoglobuline identiche [1].

Queste condizioni rappresentano un campo di ricerca rilevante, poiché sono associate a un'ampia gamma di malattie, tra cui il mieloma multiplo, la macroglobulinemia di Waldenström, le gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS) e altre forme di neoplasie linfoproliferative.

## **Proteine plasmatiche**

Le proteine plasmatiche svolgono un ruolo cruciale in quanto fungono da **indicatori biologici**: eventuali alterazioni delle loro concentrazioni possono indicare la presenza di diverse patologie.

Sono localizzate a livello del **plasma**, fluido leggermente alcalino con caratteristico colore giallo, costituito da:

- 90% circa da acqua,
- 10% da sostanze organiche (glucidi, lipidi, proteine, ormoni, aminoacidi, vitamine) e minerali dissociati in ioni positivi e negativi [2].

## **Cosa sono le immunoglobuline (anticorpi)**

Le immunoglobuline (o anticorpi), sono delle sostanze **glicoproteiche** con funzione anticorpale, sintetizzate durante la **risposta immunitaria umorale** (meccanismo immunitario mediato dalle immunoglobuline) da parte dei linfociti B attivati.

I **linfociti B** subiscono una serie di modifiche che li portano a differenziarsi in **plasmacellule** in grado di secernere gli anticorpi maturi [3].

Lo scopo degli anticorpi è quello di riconoscere e legare in maniera estremamente specifica un antigene (Ag) normalmente appartenente ad un agente patogeno.

Le immunoglobuline si trovano ancorate sulla membrana plasmatica dei linfociti B e sono da essi sintetizzate e secrete nel circolo sanguigno, nelle mucose e nei tessuti.

Inoltre, ci sono i linfociti T che partecipano attivamente alla risposta immunitaria umorale poiché stimolano la produzione di linfociti B [4] [5].

Nell'uomo le immunoglobuline sono divise in cinque classi:

- IgA
- IgD
- IgE
- IgG
- IgM

### **Struttura**

Le immunoglobuline hanno una struttura di base uguale, simile a una **Y**.

Essa consiste di:

- 2 catene **pesanti** identiche (H, peso molecolare 50-60 kDa),
- 2 catene **leggere** identiche (L, peso molecolare 20-25 kDa)
- gruppi glucidici in numero variabile.

Lo stelo della Y, noto come **frammento cristallizzabile (Fc)**, permette all'anticorpo di essere riconosciuto e legato da recettori specifici (**FcR**) presenti sulla superficie delle cellule del sistema immunitario e di interagire con proteine del sistema del complemento, attivato durante le infezioni.

Le due braccia della Y sono responsabili della specificità di riconoscimento dell'agente microbico, specialmente nelle loro estremità [6].

Esistono cinque varianti di catene pesanti (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) e due varianti di catene leggere (kappa e lambda).

La natura delle **catene pesanti** determina la classe delle Ig, mentre la natura delle **catene leggere** determina le sottoclassi (kappa o lambda).

Ciascuna catena leggera è legata alla pesante da un **ponte disolfuro** e da **legami non covalenti** [6].

Sia le regioni variabili che quelle costanti, presentano domini simili a forma globulare e sono formate dalla sovrapposizione di due strati a *beta* foglietto antiparallelo (ripiegamento dell'immunoglobulina).

La regione variabile delle catene è il sito in cui è possibile riconoscere e legare gli antigeni.

In condizioni fisiologiche, vengono prodotte dai linfociti in maggiore quantità le catene leggere rispetto alle catene pesanti.

Le catene in eccesso vengono rilasciate nel torrente ematico e in piccola percentuale filtrate dai reni.

L'aumento nella concentrazione delle catene leggere può essere sia solo delle catene leggere kappa sia solo delle catene leggere lambda (la plasmacellula produce solo una parte non interamente formata dell'immunoglobulina), ma anche di immunoglobuline completamente formate.

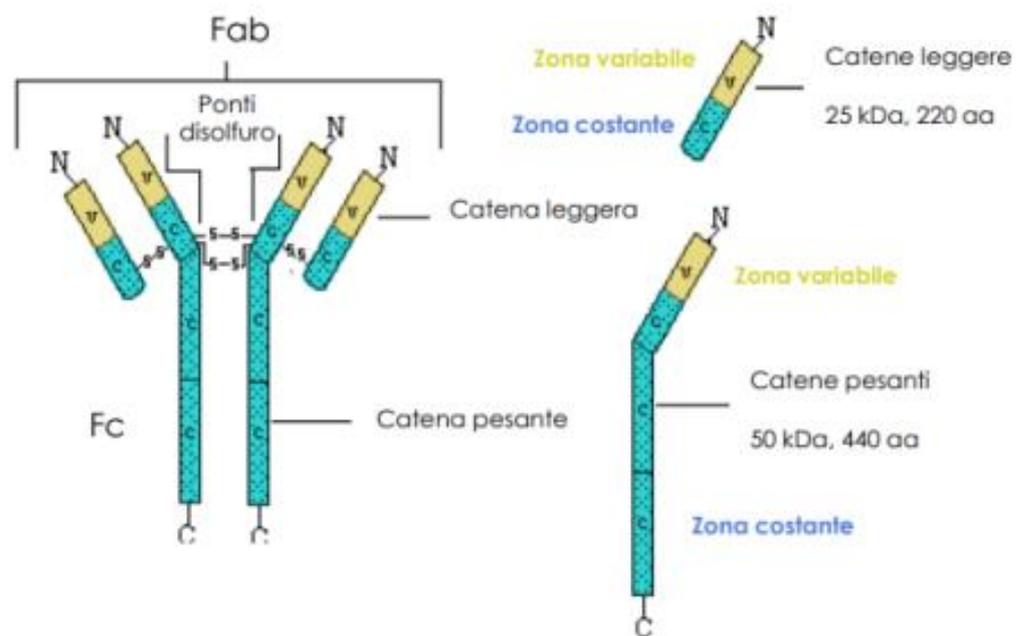
Una condizione **policlonale** indica che le catene leggere presenti sono ottenute in seguito alla produzione da parte di tutti i diversi cloni di linfociti, i quali contribuiscono alla produzione di immunoglobuline per la difesa del nostro organismo.

Questa situazione di policlonalità può essere originata da un danno all'apparato renale, in quanto è ridotta la capacità dell'organismo di espellere le catene leggere.

Solitamente in casi di danno renale entrambe le catene leggere (kappa e lambda) vanno incontro ad aumento.

Nel secondo caso, in situazioni di **monoclonalità**, l'aumento della concentrazione delle catene leggere monoclonali spesso deriva da un'alterata produzione di catene di un **unico** tipo, da parte di un **singolo clone** di linfociti che aumenta indiscriminatamente e sfocia in una situazione di patologia [7].

Questa condizione è presente in svariate patologie, come ad esempio il mieloma multiplo, la macroglobulinemia di Waldenström... [8]



*Immagine 1* [9]

## **IgG**

Rappresentano il 75-80% delle immunoglobuline circolanti. Si tratta degli anticorpi maggiormente presenti nelle **reazioni immunitarie secondarie** e presentano altissima specificità anticorpale.

Sono in grado di attraversare la barriera placentare poiché sono **monomeriche** e si trovano a concentrazioni elevate fin dalla nascita, conferendo protezione immunitaria dai 0 ai 6 mesi di vita (detti anche *anticorpi immuni*) [10].

Le **tecniche immunochimiche** utilizzano nella maggior parte dei casi questa classe di immunoglobuline.

## **IgA**

Costituiscono il 20% delle immunoglobuline totali. Possono essere sia monomeriche che **dimeriche** (situazione più frequente).

La loro funzione è legata all'immunità delle **mucose** e all'immunità **neonatale**.

Si trovano maggiormente nelle secrezioni (bronchiali, salivari, duodenali) sotto forma di immunoglobuline **secretorie o esocrine** [11].

## **IgM**

Fanno parte delle **macroglobuline**. Si trovano nel **siero** sotto forma di **pentameri** (5 unità di IgM identiche disposte a raggiera), quindi non passano la placenta.

Costituiscono la prima classe di anticorpi ad essere prodotti a seguito di una reazione immunitaria e si tratta di anticorpi **naturali**.

Rappresentano gli anticorpi più efficienti nel legare le particelle virali e batteriche [12].

## **IgD**

Le IgD nel siero sono presenti unicamente in tracce. Si trovano principalmente fissate alla **superficie** dei linfociti, dei quali inducono proliferazione in risposta a un antigene [12].

Il loro compito primario è quello di recettori di membrana per l'antigene [14].

## **IgE**

Le IgE sono presenti nel siero in **bassissime concentrazioni**, sono responsabili delle risposte ai parassiti (elminti) e sono correlate alla presenza di malattie allergiche.

Si caratterizzano per la capacità di fissarsi con il frammento cristallizzabile (Fc) sulla superficie dei basofili e dei mastociti, causandone la **degranulazione**.

L'istamina stessa agisce da recettore dei mastociti causando, in seguito all'interazione con l'antigene, degranulazione che è all'origine della reazione anafilattica [13]

## **Antigeni**

Si tratta di molecole in grado di combinarsi con gli anticorpi.

Viene definita **epitopo** (o determinante antigenico) la regione dell'antigene riconosciuta specificamente dai recettori di membrana dei linfociti T e B.

Possono essere antigeni: proteine, glicoproteine e polisaccaridi [14].

Esistono alcune di queste molecole capaci di produrre una risposta immunitaria, perciò vengono definite **sostanze immunogene**.

## **Crioglobuline**

Sono delle immunoglobuline formate da **proteine anomale** circolanti nel torrente ematico.

Si trovano anche nel sangue di persone sane, seppur a concentrazioni ridotte e sono in grado di formare aggregati e precipitare a temperature minori di 37°C.

Spesso la loro presenza è correlata a diverse patologie:

- **Vasculiti** (in cui si ha un evento flogistico a livello dei vasi sanguigni);
- Malattie a carico dei **reni**;
- Malattie **autoimmuni** (artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico);
- Malattie **infettive** (HCV, HIV, mononucleosi);
- **Neoplasie** (linfomi, leucemie linfatiche e mieloma multiplo);

La formazione degli aggregati proteici può causare danni a livello tissutale ed articolare, mentre gli organi più frequentemente colpiti sono il fegato ed i reni [7] [15].

## **Le gammopatie monoclonali**

Le gammopatie monoclonali sono **disordini ematologici** caratterizzati dalla proliferazione di uno o più cloni cellulari che producono un prodotto specifico (componente monoclonale) che può essere riscontrato nel **siero** e/o nelle **urine**.

È rilevabile la presenza nel sangue dei pazienti di un anticorpo monoclonale prodotto dalle plasmacellule appartenenti al sistema immunitario. L'alterazione di queste particolari cellule è l'evento scatenante di tutte le gammopatie monoclonali.

Di solito la sintesi degli anticorpi si presenta in modo **eterogeneo**, con ciascun clone di plasmacellula che secerne solo una delle catene pesanti disponibili: gamma  $\gamma$ , mu  $\mu$ , alpha  $\alpha$ , delta  $\delta$ , o epsilon  $\epsilon$ , e una delle catene leggere, kappa  $\kappa$  o lambda  $\lambda$  durante il suo ciclo vitale.

Le plasmacellule si localizzano nel midollo osseo e secernono grandi quantità di immunoglobuline tutte con la stessa specificità (componente monoclonale) [16].

## **Gammopatia monoclonale di incerto significato - MGUS**

Le gammopatie monoclonali comprendono malattie differenti tra loro, tra cui le **gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS)**, condizioni molto comuni, spesso benigne, causate da un'eccessiva proliferazione di plasmacellule che non causano alcun sintomo e richiedono semplicemente un monitoraggio clinico [17].

Si tratta delle patologie maggiormente riscontrate in caso di disordini ematologici: costituiscono l'80-90% dei casi di gammopatie monoclonali [18].

Queste patologie **benigne** vengono diagnosticate principalmente in soggetti anziani: ad esempio nello studio di McMaster e Landgren [19] la loro prevalenza è stimata intorno all'1-2%.

La prevalenza stimata di MGUS nello studio di Bladé [20] costituito da una coorte di 150 pazienti, con età superiore ai 50 anni è del 3.2% [21].

Inoltre, fattori come il genere e l'etnia sembrerebbero influire significativamente: in studi di popolazione come quello svolto da Cicero et al, in cui l'incidenza è stata pari al 3.7% negli uomini e del 2.9% nelle donne.

Mentre in studi riguardanti la popolazione giapponese è stata riscontrata un'incidenza ridotta in entrambi i generi: 2.8% negli uomini e 1.6% delle donne.

In aggiunta, le MGUS sono maggiormente diffuse nella popolazione nera (6-8%) rispetto alla popolazione bianca (3-4%) [22].

Tuttavia, nelle fasce d'età più avanzate, questa percentuale può aumentare fino al 9%. [23]

Per quanto riguarda la situazione in Italia, un'indagine condotta su 35.000 pazienti ospedalizzati, con un'età compresa tra gli 11 e i 75 anni, ha evidenziato che il 2.9% di essi presenta componenti monoclonali [24] [25].

La presenza di una componente monoclonale può essere correlata a condizioni patologiche e situazioni cliniche come:

1. tumori del sistema **linfatico** e **midollo osseo** (leucemia linfatica cronica, leucemia mieloide cronica, mielodisplasia);
2. neoplasie che coinvolgono tessuti **solidi** (carcinoma del colon e della mammella);
3. condizioni patologiche **non neoplastiche** (sarcoidosi, cirrosi epatica, morbo di Gaucher);
4. disturbi **autoimmuni** (artrite reumatoide, miastenia gravis);

5. patologie **infettive** (tubercolosi, parassitosi, infezioni virali);
6. anomalie delle cellule **plasmatiche** (MGUS, morbo di Waldenström).

### **Come si contrae la malattia**

Le **plasmacellule** sono cellule del sistema immunitario presenti a livello del midollo osseo, deputate a produrre gli anticorpi, che permettono di riconoscere ed eliminare virus e batteri, proteggendo l'organismo dalle infezioni.

In condizioni fisiologiche ogni plasmacellula produce un anticorpo specifico, lievemente diverso da quello prodotto dalle altre plasmacellule [26].

Questa varietà permette al sistema immunitario di riconoscere sostanzialmente tutti i possibili pericoli. Nelle gammopatie monoclonali, una plasmacellula subisce una "trasformazione" ed inizia a moltiplicarsi in maniera incontrollata e anomala, producendo varie copie di sé stessa. In questo modo si crea un gruppo di cellule **identiche** tra loro, cioè **cloni** [27].

Tutte le cellule del clone producono il medesimo anticorpo, che è denominato **monoclonale** proprio perché derivante da un singolo clone di cellule, a differenza degli anticorpi normalmente presenti nel sangue, che provengono da numerosi cloni diversi.

Si suppone che la trasformazione delle plasmacellule sia causata da **mutazioni** che colpiscono il loro DNA. Le mutazioni possono derivare da **errori casuali** che avvengono durante il normale sviluppo delle plasmacellule.

Tuttavia, anche fattori **genetici** o **ambientali** possono contribuire alla loro formazione.

In letteratura non si conoscono fattori di rischio strettamente correlati allo sviluppo delle gammopatie monoclonali.

È ipotizzabile che una esposizione ambientale a determinate sostanze chimiche, come gli **insetticidi** o gli **erbicidi**, così come l'esposizione alle **radiazioni ionizzanti** e potenzialmente anche a certi **virus**, possa aumentare il rischio di sviluppare una gammopatia monoclonale.

Anche la predisposizione genetica in alcuni casi può influenzare la probabilità di ammalarsi.

Tuttavia, le gammopatie monoclonali non sono malattie ereditarie [28].

### **Classificazione**

La componente monoclonale può essere sia costituita da anticorpi **interi** (formati da due catene pesanti e da due catene leggere), sia **solo da catene kappa o lambda** (se la plasmacellula produce solamente quella proteina non completamente assemblata).

Queste proteine presentano una certa **variabilità strutturale**, la quale viene sfruttata per la categorizzazione delle componenti monoclonali:

- le catene pesanti possono essere di isotipo **G** o **A**, molto più raramente **D** o **M**;
- le catene leggere possono essere di isotipo **kappa (k)** o **lambda (λ)**.

Per discriminare tra le diverse condizioni delle gammopatie monoclonali, vengono frequentemente considerati tre criteri:

- La possibile presenza di **sintomi** correlati alla gammopatia.
- La concentrazione della para-proteina/**componente monoclonale** nel flusso sanguigno.
- La proporzione di **plasmacellule** presenti nel midollo osseo.

In questo modo è possibile identificare differenti condizioni cliniche, tra cui:

- **Mieloma multiplo:** la percentuale di plasmacellule nel midollo osseo è >10%, e può essere associata a una componente monoclonale nel sangue >3 g/dl [29].
- **Gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS):** la componente monoclonale è <3 g/dl, la percentuale di plasmacellule midollari atipiche è <10% e si ha l'assenza clinica di segni/sintomi riconducibili al mieloma multiplo (ipercalcemia, anemia, insufficienza renale, presenza di lesioni ossee) [30].

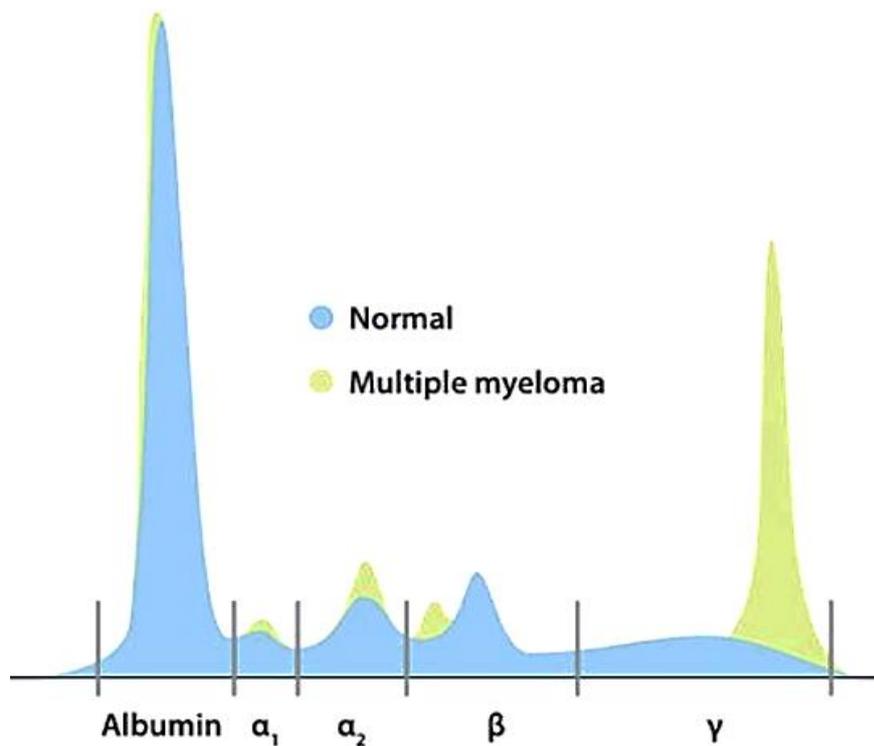
### **Mieloma multiplo**

Il secondo tumore del sangue più diffuso al mondo è il **mieloma multiplo**, con più di 160000 nuovi casi all'anno.

Dal 2000 il numero annuo di nuovi pazienti con diagnosi di mieloma multiplo è aumentato del 33%, principalmente a causa del crescente invecchiamento della popolazione.

In particolare rappresenta circa l'1.2% di tutti i tipi di cancro diagnosticati tra gli uomini [31] e l'1.3% tra le donne e si stima che colpisca ogni anno in Italia circa 4.000/5000 persone [32].

È più frequente negli **anziani** (il 38% dei pazienti ha più di 70 anni), mentre solo il 2% dei pazienti ha meno di 40 anni al momento della diagnosi. L'incidenza di questo tumore è nel complesso stabile [33], mentre la mortalità è in lieve diminuzione.



*Immagine 2* [34] Esempio di tracciato elettroforetico riconducibile al mieloma multiplo.

### **Macroglobulinemia di Waldenström**

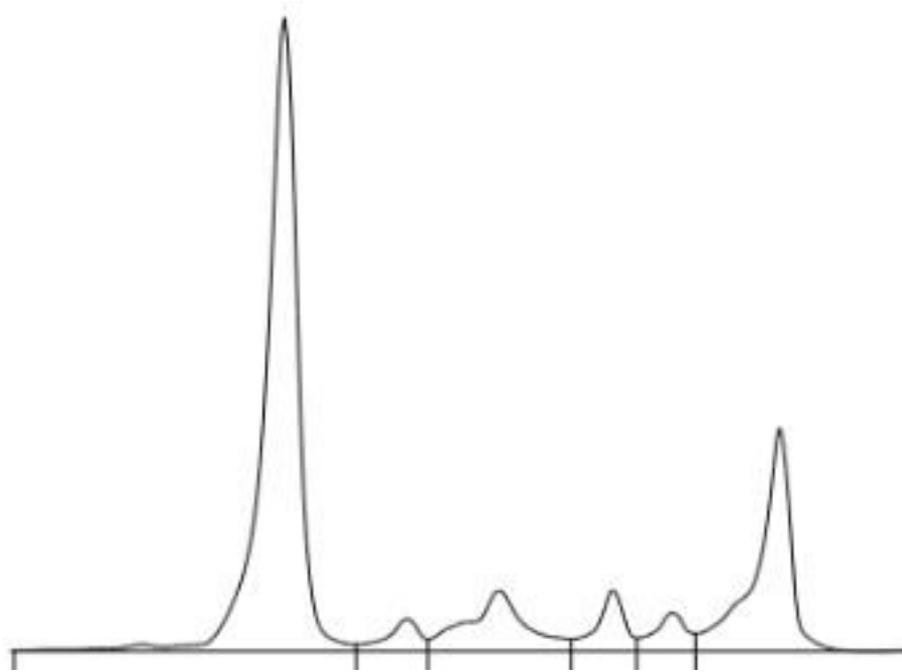
La macroglobulinemia di Waldenström è una forma particolare di mieloma multiplo, caratterizzata dalla presenza di infiltrato plasmacellulare nel midollo [35].

Il picco monoclonale non è in gamma, ma in zona beta perché le immunoglobuline che lo compongono sono sempre **IgM** (si trovano più vicino alla zona beta e risultano come se ne facessero parte). Le IgM sono di grosse dimensioni, si ha una grande viscosità del siero del paziente.

É considerata una malattia non aggressiva in quanto i pazienti con diagnosi di macroglobulinemia hanno un'aspettativa di vita piuttosto elevata.

É caratterizzata da **complicanze vascolari** causate dalle **IgM** circolanti per le proprietà fisiche, chimiche ed immunologiche della componente monoclonale [36].

Le complicanze possono essere: crioglobulinemia, anomalie della coagulazione, malattia da agglutinine fredde, anemia e sindrome da iperviscosità [37].



*Immagine 3* [38] Esempio di tracciato elettroforetico riconducibile alla macroglobulinemia di Waldenström.

### **Cirrosi epatica – Ponte beta- gamma**

Avviene la formazione di un ponte beta-gamma, causato da un marcato aumento policlonale delle immunoglobuline di tipo **A**, le quali migrano nella regione gamma in concomitanza con un aumento delle **IgM** e delle **IgG**, condizione rilevabile nella cirrosi epatica.

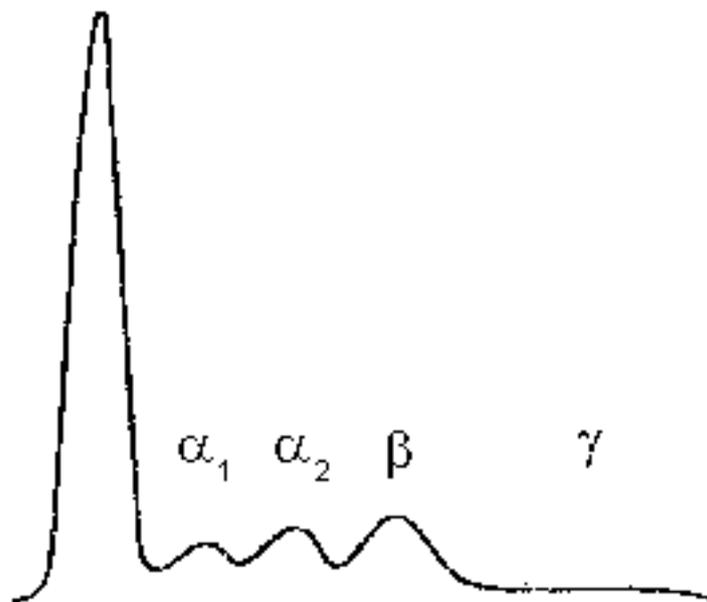
La **cirrosi epatica** è caratterizzata da **necrosi** del parenchima epatico, presenza di infiltrato leucocitario e flogosi del tessuto epatico [39].

### **Ipogammaglobulinemia**

Si tratta di una condizione caratterizzata dalla **riduzione** nel livello di **gamma** globuline nel sangue, che può presentarsi in diverse patologie, tra cui alcuni disordini renali ed epatici, oltre che in alcuni tumori sistemici.

Si hanno valori sierici di IgG spesso inferiori a 7g/l.

Nel caso in cui sia presente associata ad una componente monoclonale, è necessario ricercare la presenza di crioglobuline, le quali potrebbero “generare” una falsa ipogammaglobulinemia [40].



*Immagine 4* [41] Esempio di tracciato elettroforetico riconducibile alla ipogammaglobulinemia.

### **Gammopatia policlonale**

L'esposizione a diversi antigeni o virus che prediligono il fegato come target, può causare proliferazione di vari cloni di plasmacellule, provocando un incremento nella produzione di diverse classi di anticorpi.

All'elettroforesi le gammopatie policlonali sono caratterizzate da un aumento **diffuso** ed **eterogeneo** della frazione gamma [42].

L'aumento diffuso delle immunoglobuline nel plasma è spesso riscontrato come una risposta fisiologica alle infezioni.

Le infezioni batteriche protratte tendono ad aumentare tutti i tipi di immunoglobuline: ad esempio le IgA aumentano nelle infezioni della pelle, dell'intestino e delle vie respiratorie, mentre le IgM sono più comuni nelle fasi iniziali delle infezioni virali.

Le risposte autoimmuni tendono a essere caratterizzate da un aumento delle IgG, mentre le condizioni allergiche e l'asma sono associate ad un incremento delle IgE [43].

### **Plasmocitoma solitario**

È un tumore **raro**, contraddistinto dall'accumulo di plasmacellule tumorali in un'area ristretta dell'organismo.

Le plasmacellule nel midollo osseo sono **inferiori** al 10%, la componente monoclonale è generalmente di piccola entità (o addirittura assente) e non sono presenti i sintomi caratteristici del mieloma multiplo [44].

### **Sintomi**

Le gammopatie monoclonali di incerto significato sono sempre **asintomatiche**.

In caso di comparsa di sintomi di rilievo è necessario verificare la possibilità di una progressione a mieloma multiplo o ad altri tipi di neoplasie.

I sintomi del mieloma multiplo includono: danni renali, anemia, lesioni ossee e aumentata suscettibilità alle infezioni.

L'espansione del clone plasmacellulare a livello del midollo osseo induce la sintesi di alte concentrazioni della componente monoclonale, la quale

rappresenta il principale indicatore biologico utilizzato per diagnosticare la patologia tumorale [45] [46].

## **Diagnosi**

Spesso le patologie monoclonali vengono diagnosticate mediante indagini come esami del sangue o delle urine effettuate per **altre ragioni**.

L'esame di laboratorio di maggior rilievo per la diagnosi delle gammopatie monoclonali è l'**elettroforesi siero proteica**, che consente di quantificare i differenti tipi di proteine circolanti nel sangue.

L'elettroforesi è consigliata dall'IMWG (*International Myeloma Working Group*) per lo screening di campioni urinari e sierici per l'individuazione di anomalie proteiche [47].

Le proteine vengono separate in base al **peso molecolare** e alla **carica elettrica** e si distribuiscono in **cinque zone** o bande.

Gli anticorpi (e quindi anche le componenti monoclonali) si posizionano quasi sempre nella zona **gamma**.

Nelle gammopatie la zona gamma è alterata a causa dell'eccessiva presenza di anticorpi presenti a livello ematico.

Nelle gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS) la componente monoclonale rappresenta solo una minima parte di tutte le proteine del sangue.

In caso di mieloma multiplo invece, può costituirne una porzione molto importante.

Visto che le catene leggere prodotte dalle plasmacellule possono passare nelle urine, è necessario misurare la **proteinuria totale** delle 24 ore, cioè la quantità totale di proteine presenti nelle urine prodotte durante l'arco delle 24 ore.

In seguito alla quantificazione e tipizzazione della componente monoclonale, è necessario identificare gli eventuali danni provocati dalla malattia a livello di tessuti e organi.

A questo scopo si utilizzano:

- Gli **esami chimici** del sangue, che misurano la funzionalità renale e la quantità di calcio nel sangue, come:
  1. quantificazione IgG, IgA, IgM;
  2. catene leggere kappa e lambda;
  3. catene leggere libere kappa e lambda;
  4. proteina di Bence Jones;
  5. beta 2 microglobulina.
- L'**emocromo**, cioè la conta delle cellule del sangue, che permette la valutazione della funzionalità del midollo osseo.

Se gli esami escludono la presenza di danni dovuti alla patologia monoclonale e la quantità di componente monoclonale a livello ematico ed eventualmente nelle urine è bassa, si diagnostica una **gammopatia monoclonale di incerto significato** (MGUS).

In questo caso non sono necessari altri esami di approfondimento.

Nel caso in cui i risultati delle analisi o i sintomi presentati dal paziente sollevino il sospetto di **mieloma multiplo** è essenziale procedere con **ulteriori indagini** diagnostiche, tra cui:

- **Ecografia all'addome** per la valutazione dello stato funzionale dei linfonodi;
- **rx al torace** e alla **colonna** per valutare eventuali lesioni ossee;
- campionamento di midollo osseo tramite procedura di **mieloaspirato** o **biopsia osteomidollare**, consentendo la valutazione della presenza delle plasmacellule tumorali nel midollo [48];
- **ecodoppler**;
- indagini radiografiche, come la **TAC** dello scheletro o **radiografie** convenzionali, utilizzate per esaminare la presenza e l'estensione delle lesioni ossee associate alla condizione patologica.

Successivamente, possono essere eseguiti esami più approfonditi, come la **risonanza magnetica** (RMN) e la **PET** [49], per un'analisi più dettagliata delle singole lesioni.

Nella maggior parte dei casi la patologia non evolverà e i livelli della componente monoclonale rimarranno invariati con il passare degli anni; in questi casi i pazienti non avranno sequele correlate alle MGUS.

Un'altra percentuale di pazienti vedrà aumentare i propri livelli della componente monoclonale ma non sufficientemente per provocare la malattia.

Infine, in un'ulteriore quota di pazienti la patologia benigna può evolvere in un **mieloma multiplo**, in una **macroglobulinemia di Waldenström**, in un **plasmocitoma solitario**...

Il passaggio da condizione benigna a cancerosa potrà essere molto lento o molto rapido a seconda della diagnosi effettuata dal clinico [50].

## Terapia

Le gammopatie monoclonali di incerto significato non necessitano di trattamenti specifici, ma richiedono **controlli regolari** per monitorare la possibile evoluzione verso il mieloma multiplo.

Questi controlli vengono eseguiti ogni **3-6 mesi**, con la possibilità di renderli annuali se i valori del paziente rimangono stabili.

Per i pazienti colpiti da mieloma multiplo, generalmente si decide di iniziare il trattamento se si riscontra **almeno uno** dei quattro sintomi chiave della malattia:

- **anemia** (emoglobina <10g/dl o 2g/dl sotto il limite di normalità);
- **insufficienza renale** (creatinina >2 mg/dl);
- **elevata quantità di calcio nel sangue** (>11,5 mg/l);
- **danno osseo** [51].

Anche un aumento della frequenza delle infezioni batteriche e i sintomi dovuti all'elevata viscosità del sangue (confusione, cefalea, emorragie) o alla deposizione di anticorpi a livello dei tessuti possono evidenziare la necessità di iniziare la terapia.

Nei pazienti affetti da mieloma multiplo ma **asintomatici**, si effettuano solo controlli frequenti e si rimanda l'inizio del trattamento al momento dell'eventuale comparsa di sintomi [52].

## Terapia del mieloma multiplo

Negli ultimi anni la disponibilità di nuovi farmaci ha reso le terapie del mieloma multiplo maggiormente efficaci e ha posto le basi per un miglioramento della speranza di vita dei pazienti colpiti dalla malattia.

Tuttavia le terapie attualmente in uso non consentono ancora, nella maggior parte dei casi, di portare ad una remissione della malattia [53].

Lo scopo del trattamento è quello di ottenere un buon **controllo** della malattia e migliorare la qualità della vita del paziente.

Il percorso terapeutico non è identico per tutti i pazienti e viene deciso sulla base di numerosi elementi, tra cui l'età del paziente, le caratteristiche della malattia e la presenza di eventuali altre malattie.

La variabile di maggiore rilevanza per la scelta della terapia è l'**età** del paziente al momento della diagnosi.

I pazienti sotto i 65-70 anni, se non affetti da altre malattie importanti, possono iniziare un **trattamento intensivo**, che può includere un autotrapianto di cellule staminali (trapianto autologo).

I pazienti oltre i 70 anni ricevono trattamenti ugualmente efficaci ma meno intensivi [54].

### **Pazienti con età inferiore ai 65-70 anni di età al momento della diagnosi**

Il programma terapeutico dei pazienti con età inferiore ai 65-70 anni di età al momento della diagnosi inizia con la **terapia di induzione**, che ha lo scopo di ridurre al minimo la quantità di cellule tumorali e di alleviare i sintomi.

La terapia di induzione utilizza una combinazione di farmaci, che include solitamente il farmaco "mirato" **bortezomib** [55] e può comprendere o meno farmaci chemioterapici.

Il bortezomib è un inibitore del **proteasoma**. I proteasomi hanno un ruolo importante nel controllo della proliferazione e della funzione cellulare.

Il farmaco interferisce con la loro funzione, permettendo la morte delle cellule tumorali. È utilizzato nel trattamento del mieloma multiplo in pazienti di età superiore ai **18 anni** [56].

Per lo più, la terapia di induzione viene somministrata in un contesto ambulatoriale (senza necessità di ricovero) ed è solitamente ben accettata dal paziente.

Dopo il completamento della terapia di induzione, qualora non sussistano controindicazioni, è possibile iniziare la procedura per il trapianto autologo di cellule staminali.

La prima fase della procedura consiste nella mobilizzazione delle cellule staminali: grazie alla somministrazione di appositi farmaci, le cellule staminali del paziente si spostano dal midollo osseo (dove si trovano normalmente) al sangue [57].

Le cellule staminali vengono poi prelevate dal sangue e conservate a bassissime temperature (**criopreservate**).

La fase successiva consiste nella somministrazione di una chemioterapia ad alte dosi, seguita dalla rinfusione delle cellule staminali criopreservate.

La chemioterapia ad alte dosi (**melphalan**) causa una importante **citopenia** (riduzione delle cellule del sangue), che espone il paziente ad un elevato rischio di infezioni [58].

Per questo, durante la fase di citopenia, il paziente è ricoverato in una camera sterile.

Dopo il trapianto, il paziente conclude il programma terapeutico con una **fase di consolidamento**, che ha l'obiettivo di migliorare e rendere più duratura la risposta ottenuta, garantendo un controllo più duraturo della malattia [59].

### **Pazienti con età superiore ai 65-70 anni al momento della diagnosi**

La gestione terapeutica dei pazienti **anziani** è notevolmente semplificata, poiché non comporta la fase di trapianto ma aspira comunque a risultati soddisfacenti.

In questa situazione l'obiettivo rimane quello di ottenere la massima risposta terapeutica al fine di garantire un monitoraggio a lungo termine della condizione di salute.

I farmaci “mirati” di nuova generazione sono molto utilizzati anche per il trattamento dei pazienti con età superiore ai 60 anni, in combinazione con i trattamenti chemioterapici a basse dosi che venivano già impiegati in precedenza con buoni risultati.

## Tecniche biochimiche e immunochimiche per la diagnosi delle gammopatie monoclonali

### Elettroforesi

Il termine **elettroforesi** indica un'analisi di laboratorio in grado di separare diverse macromolecole cariche mediante l'applicazione di un **campo elettrico**.

Consente di ottenere importanti informazioni riguardo la **quantità di proteine** presenti nel siero sanguigno o in altri campioni biologici, oltre ad essere in grado di rivelare eventuali anomalie qualitative.

La separazione avviene in base alla mobilità elettroforetica e alla dimensione.

La migrazione delle proteine è influenzata da dimensione, massa, forma e carica.

Si tratta di una metodica sia quantitativa che qualitativa, utilizzata in biologia molecolare e in biochimica per lo studio di **proteine** e **acidi nucleici** (RNA e DNA) [60].

Una molecola carica si muove all'interno di un campo elettrico con una **velocità** che dipende dalla quantità di **carica** che porta, dalle sue **dimensioni** e dalla sua **forma**, secondo la legge:

$$v = E \frac{q}{f}$$

Di cui:

$v$  = velocità

$E$  = gradiente di potenziale

$q$  = carica

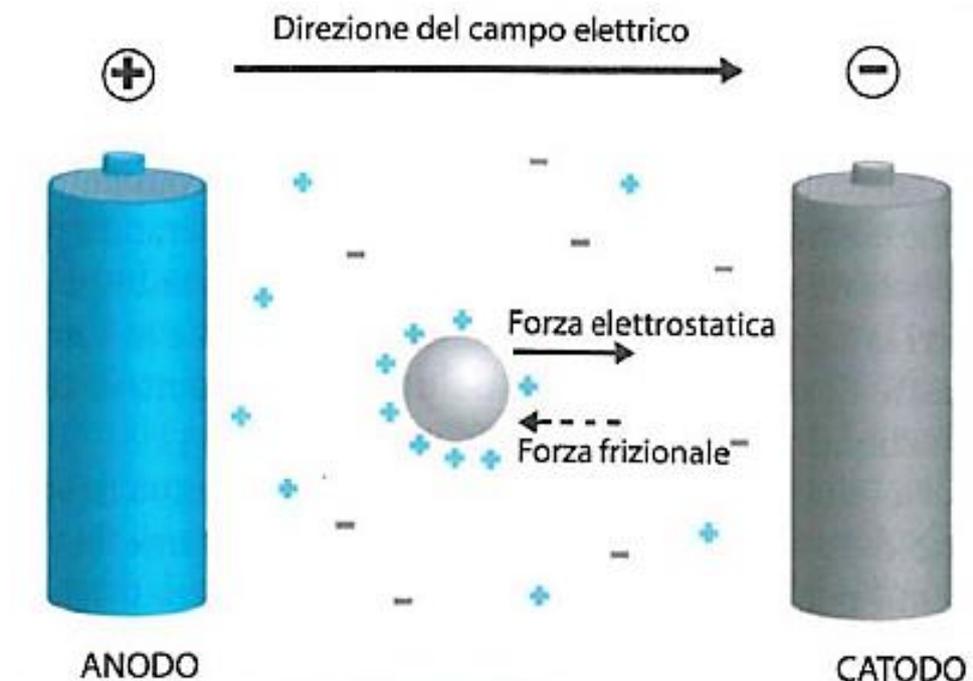
$f$  = coefficiente di frizione, dipende da dimensioni e forma della molecola e dalla viscosità/costante dielettrica del mezzo

In genere al posto della velocità si utilizza la **mobilità elettroforetica**: esprime la tendenza di una molecola carica a spostarsi all'interno di un campo elettrico applicato.

La mobilità elettroforetica è dipendente da:

- carica;
- dimensione;
- viscosità del mezzo.

In condizioni definite, la mobilità elettroforetica è una proprietà intrinseca di una molecola, che può essere utilizzata per analizzare molecole diverse [61].



*Immagine 5* [62]

Mediante l'elettroforesi è possibile **separare** nel campione le seguenti proteine:

- **alfa 1** globuline;
- **alfa 2** globuline;
- **beta** globuline;
- **gamma** globuline.

Molto spesso le beta globuline vengono suddivise in beta 1 globuline e beta 2 globuline.

Vengono utilizzati diversi tipi di supporti nell'elettroforesi, che funzionano da setacci molecolari:

- gel di agarosio;
- acetato di cellulosa;
- gel di poliacrilamide (PAGE).

### **Gel di agarosio**

Il gel di agarosio è un materiale **insolubile** in acqua a temperatura ambiente. Viene ampiamente utilizzato in biologia molecolare e in laboratorio per la separazione e la purificazione di molecole biologiche come il DNA e le proteine [63].

Si tratta di un materiale costituito da due polimeri: **agaropectina** e **agarobiosio**.

Per poter sciogliere il gel di agarosio è necessario aumentare la temperatura fino all'ebollizione.

Mediante un processo di **gelificazione** si creano dei pori all'interno del gel, di dimensioni inversamente proporzionali alla concentrazione di agarosio.

La dimensione è la grandezza utilizzata per effettuare la separazione delle molecole d'interesse.

### **Acetato di cellulosa**

Si tratta di una matrice inerte che **non** manifesta fenomeni di adsorbimento. È prevalentemente impiegato nel contesto clinico per la separazione delle proteine presenti nel **siero**, la componente liquida del sangue ottenuta dopo la rimozione dei globuli e delle proteine coagulate [64].

### **Gel di poliacrilamide**

Matrice costituita da **acrilammide** e **bisacrilammide**.

Le proteine sono localizzate in un **tampone**, il quale contiene al suo interno SDS (sodio dodecilsolfato) e DTT (ditiotreitolo). [65]

Presenta diverse caratteristiche favorevoli alla sua applicazione, come:

- ottima stabilità del gel;
- minima presenza di interazioni con la matrice delle molecole;
- alto potere risolutivo per la caratterizzazione di proteine e acidi nucleici di piccole dimensioni.

La porosità del gel differisce in base alla concentrazione di acrilammide e bisacrilammide.

Vi sono due tipologie di gel, la differenza è data dal **diametro** dei pori:

- gel ad **alta** percentuale di acrilammide: i pori sono di ridotte dimensioni e rendono complicata l'entrata delle proteine di medie/grosse dimensioni.
- gel a **bassa** percentuale di acrilammide: i pori sono di dimensioni maggiori e consentono un passaggio più facile delle proteine di grosse dimensioni.

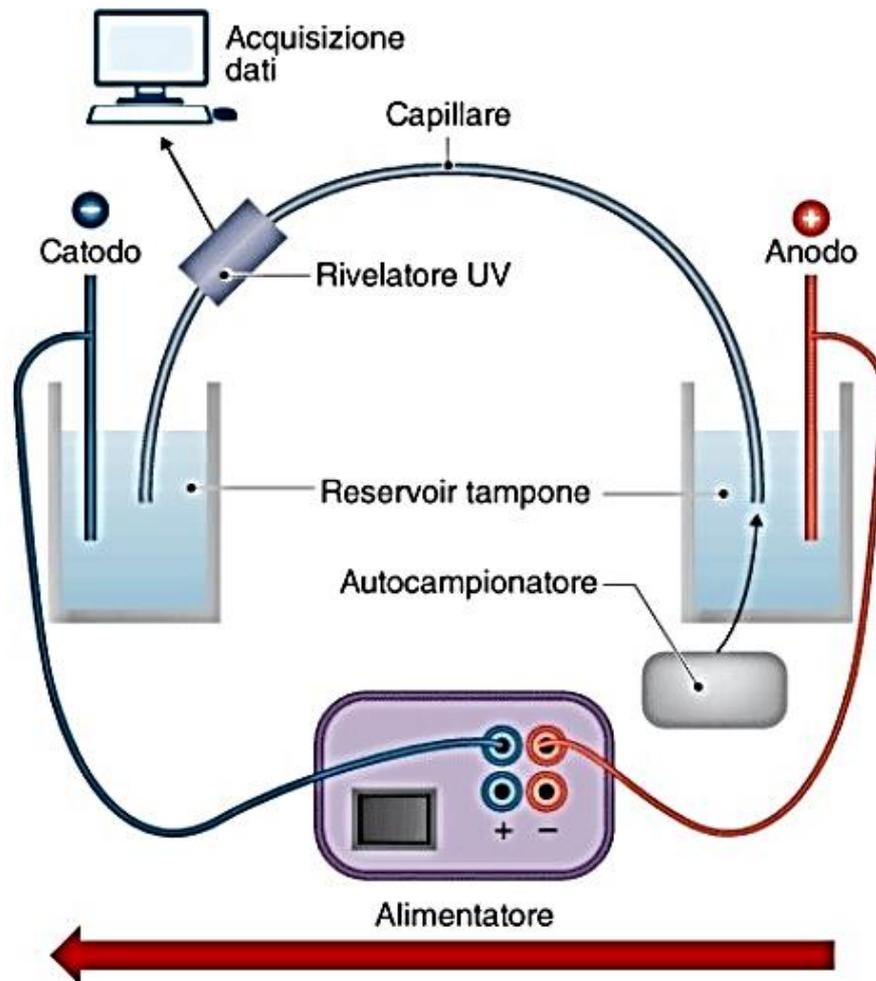
## **Elettroforesi capillare**

L'elettroforesi capillare, nota anche come **elettroforesi di zona capillare**, consente la separazione delle specie ioniche sfruttando le loro cariche e le forze di attrito.

A differenza dell'elettroforesi classica, dove particelle cariche si muovono in un liquido conduttivo sotto l'influenza di un campo elettrico, questa tecnica sfrutta un piccolo **capillare riempito con un elettrolita** per separare le specie in base alle loro dimensioni relative alla carica.

La separazione avviene in fase liquida a 24°C per 5 minuti a 8000V e le sieroproteine migrano in base alla carica elettrica e alla ripartizione cromatografica sulle pareti del capillare (si usa un micro-capillare in **silice** fusa riempito da una sostanza che funge da setaccio molecolare).

La rivelazione avviene senza ausilio di coloranti tramite misura dell'assorbanza a 214nm da parte un detector UV posto alla fine del capillare [66].



*Immagine 6* [67]

Mediante analisi elettroforetica del siero (frazione liquida del sangue) è possibile individuare **sei** gruppi di proteine, ognuno con diversa rapidità di migrazione dall'anodo verso il catodo.

La separazione delle proteine è possibile grazie all'applicazione di un **campo elettrico**, a un pH leggermente basico (8.2) [68].

Le componenti sono:

- **albumina**;
- **alfa 1 globuline**: alfa 1 anti-tripsina, HDL, tutte le proteine infiammatorie....;
- **alfa 2 globuline**: alfa 2 macroglobulina, aptoglobina, PCR....;

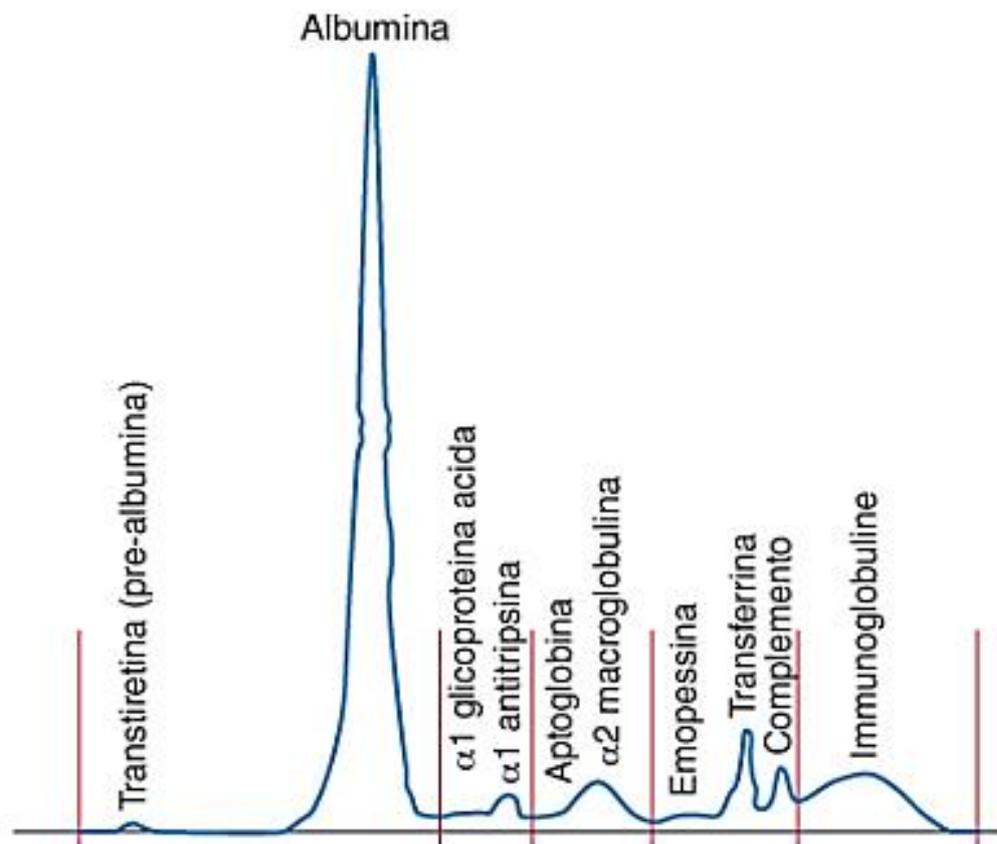
- **beta 1 globuline:** transferrina...;
- **beta 2 globuline:** lipoproteine, beta-2-microglobulina...;
- **gamma globuline:** costituite da anticorpi.

Prima dell'indagine elettroforetica si consiglia di astenersi dal cibo per un periodo compreso tra 10 e 12 ore.

È importante evitare l'assunzione di alimenti ricchi di grassi come trigliceridi e colesterolo, poiché possono compromettere l'accuratezza dei risultati.

Inoltre è opportuno considerare che terapie che includono steroidi anabolizzanti, androgeni, ormoni della crescita, insulina e antibiotici possono avere un impatto variabile sulle misurazioni effettuate durante l'analisi.

## Composizione del tracciato elettroforetico



*Immagine 7* [67]

### Albumina

L'albumina è la proteina plasmatica più rappresentata, costituisce circa il 60% di tutte le proteine plasmatiche.

Prodotta a livello **epatico**, ha diverse funzioni:

- mantenere il **corretto volume** di liquidi all'interno dell'organismo (pressione oncotica);
- svolgere un ruolo cruciale per la corretta **distribuzione** dei **liquidi** nei capillari e nei tessuti;
- permettere il **trasporto** di diversi metaboliti (principi attivi dei farmaci assunti, ormoni tiroidei, bilirubina, acidi grassi liberi);

- svolgere anche funzioni di riserva di aminoacidi [69].

I valori di riferimento adottati dal laboratorio Medical per l'albumina sono:

- Percentuale: tra 54% e 66%
- Concentrazione: tra 3.35 e 4.75 g/dl

Un **aumento** dell'albumina significa che per differenza le altre proteine sono diminuite e si ha una buona funzionalità epatica.

Una **riduzione in percentuale** significa che le altre proteine sono aumentate, condizione che può indicare patologie infiammatorie, celiachia, patologie epatiche, malnutrizione e malassorbimento.

Una **riduzione** sia in percentuale che in quantità indica che il fegato non sta funzionando correttamente e non produce correttamente la quota proteica.

Questa alterazione epatica spesso indica cirrosi epatica, patologia caratterizzata da una grave e irreversibile anomalia delle cellule epatiche con la conseguente perdita delle sue funzioni.

### **Pre-albumina**

Il nome **pre-albumina** deriva dalla sua capacità di migrare più rapidamente dell'albumina.

É la prima proteina a separarsi nella zona anodica (carica positivamente).

Prodotta a livello epatico, è considerata il migliore indicatore precoce del cambiamento dello stato nutrizionale in quanto la sua produzione risente di un'alimentazione adeguata, per cui la sua diminuzione è tipica della malnutrizione calorico-proteica o di un alterato assorbimento delle proteine (celiachia) [70].

## **Bisalbuminemia**

Consiste nella presenza contemporanea di **due** varianti di albumina.

Si tratta di una condizione **rara**, di origine acquisita o genetica, che può essere permanente o transitoria e non riveste alcun significato clinico [71].

## **Alfa-1 globuline**

Hanno una funzione principalmente di trasporto, in particolare di lipidi, grassi ematici e degli ormoni (alfa-1 anti-tripsina, alfa-1 glicoproteina acida, alfa-1 fetoproteina, siero amiloide-A...).

I valori di riferimento adottati dal laboratorio Medical per le alfa-1-globuline sono:

- Percentuale: tra 3% e 6%
- Concentrazione: tra 0.21 e 0.43 g/dl

Un **aumento** si ha in presenza di eventi flogistici, malattie infiammatorie croniche o di tumori.

Una **riduzione** è solitamente dovuta ad un deficit di alfa 1-antitripsina (condizione ereditaria in cui l'assenza dell'enzima omonimo provoca disturbi a livello epatico e polmonare) oppure a patologie epatiche.

## **Alfa-2 globuline**

Analogamente alle alfa 1-globuline, sono deputate al trasporto di ormoni e lipidi (ceruloplasmina, aptoglobina, globulina legante gli ormoni tiroidei-TBG, proteina C reattiva) [72].

I valori di riferimento adottati dal laboratorio Medical per le alfa-2-globuline sono:

- Percentuale: tra 7% e 10%
- Concentrazione: tra 0.50 e 0.72 g/dl

Un loro **aumento** è solitamente correlato ad una forte infiammazione acuta o cronica ed altre condizioni come ipertiroidismo, insufficienza surrenalica e diabete mellito.

Una loro **riduzione** è legata ad eventi emolitici (rottura dei globuli rossi), malnutrizione, malattie epatiche, anemia megaloblastica (dovuta frequentemente a carenza di vitamina B12 e/o acido folico) [73].

### **Aptoglobina**

L'aptoglobina è una proteina sintetizzata a livello **epatico** ed è in grado di eliminare l'emoglobina libera (formatasi successivamente alla distruzione degli eritrociti) nel torrente ematico [74].

Lega l'emoglobina libera nel sangue, creando un complesso che viene rapidamente rimosso dalla circolazione ematica e indirizzato al fegato per la distruzione e il recupero del ferro.

L'emolisi degli eritrociti determina il rilascio di emoglobina in circolo, con conseguente aumento della concentrazione di emoglobina libera nel sangue.

La distruzione di quantità elevate di globuli rossi provoca una temporanea diminuzione della concentrazione di aptoglobina nel sangue perché il consumo della proteina è maggiore del tasso di produzione da parte del fegato [75].

La diminuzione dei livelli di aptoglobina può evidenziare la presenza di una condizione clinica che causa la lisi degli eritrociti.

Quando la capacità di legame dell'aptoglobina viene superata, si osserva un aumento della concentrazione di emoglobina libera nel flusso sanguigno [76], con conseguente danno ai tessuti e/o disfunzione d'organo a causa dello stress ossidativo indotto dall'emoglobina libera.

L'aumento dell'eliminazione dei globuli rossi può derivare da fattori ereditari o acquisiti quali risposte avverse a trasfusioni di sangue,

l'assunzione di determinati farmaci e/o danni meccanici, come quelli che possono verificarsi nei pazienti con valvole cardiache artificiali.

Questo processo distruttivo può manifestarsi in forme lievi o gravi, a insorgenza improvvisa o progressiva nel tempo e può condurre allo sviluppo di un'anemia emolitica [77] [78].

### **Beta-globuline**

Le beta-globuline sono proteine globulari sintetizzate a livello **epatico**. Mediante indagine elettroforetica è possibile osservare una loro mobilità intermedia rispetto alle alfa-globuline e alle gamma-globuline, in quanto sono più mobili delle gamma e meno mobili rispetto alle alfa-globuline.

Tra le proteine di questo gruppo vi sono la **transferrina** (atta al trasporto del ferro), la **beta-2-microglobulina** e le **lipoproteine**.

Rientrano in questo gruppo anche il plasminogeno, la globulina legante gli ormoni sessuali, le angiostatine ed il fibrinogeno.

I valori di riferimento adottati dal laboratorio Medical per le beta-1-globuline sono:

- Percentuale: tra 4.7% e 7.2%
- Concentrazione: tra 0.34 e 0.52 g/dl

I valori di riferimento adottati dal laboratorio Medical per le beta-2-globuline sono:

- Percentuale: tra 3.2% e 6.5%
- Concentrazione: tra 0.23 e 0.47 g/dl

Un loro **aumento** è osservabile in caso di ipercolesterolemia, anemia da carenza di ferro e sindrome nefrosica.

Una loro **diminuzione** può essere conseguenza di insufficiente apporto proteico e cirrosi epatica.

## Gamma-globuline

Sono costituite da **anticorpi** (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM).

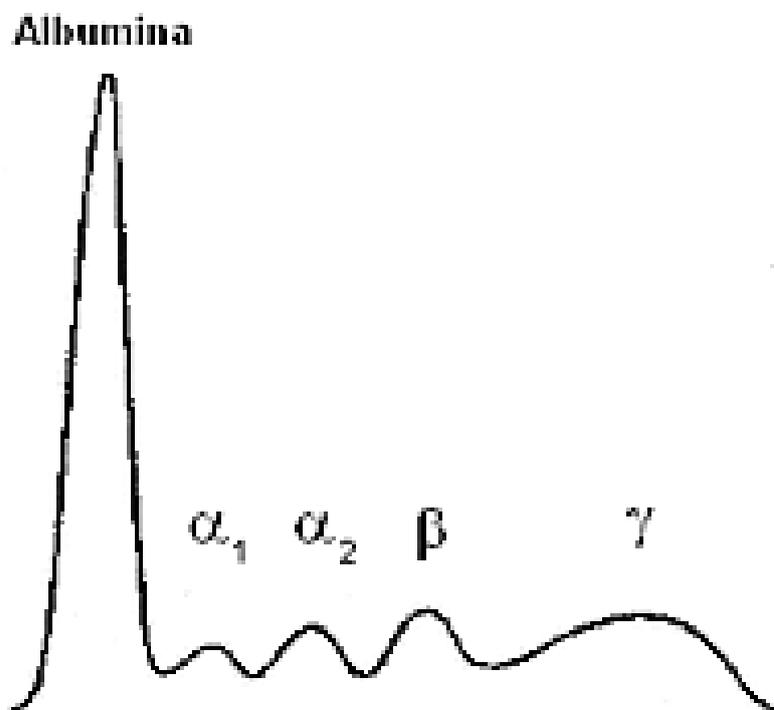
I valori di riferimento adottati dal laboratorio Medical per le gamma-globuline sono:

- Percentuale: tra 12% e 20%
- Concentrazione: tra 0.86 e 1.44 g/dl

Un loro **aumento di tipo policlonale** può essere associato a malattie infiammatorie croniche, infezioni acute e croniche, artrite reumatoide e *lupus* eritematoso sistemico.

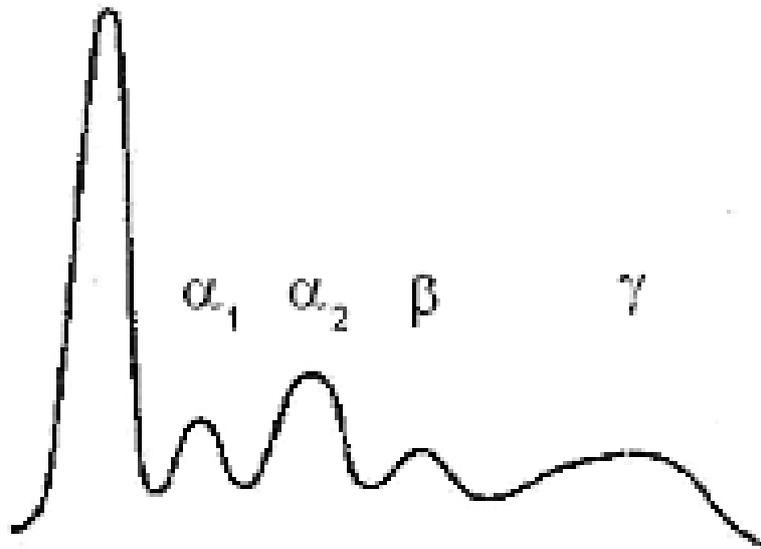
In particolare, un **aumento monoclonale** si associa a presenza di alcuni tumori, mieloma multiplo, gammopatie monoclonali ad incerto significato (MGUS) [79].

Una loro **diminuzione** è indice di immunodeficienza.



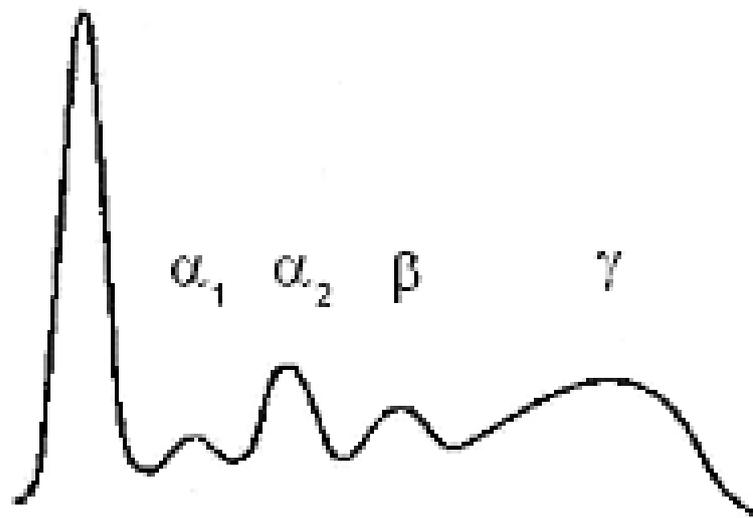
*Immagine 8* [80] Tracciato elettroforetico non patologico

**Albumina**



*Immagine 9* [80] Tracciato elettroforetico in caso di processi infiammatori acuti

**Albumina**



*Immagine 10* [80] Tracciato elettroforetico in caso di processi infiammatori cronici

## **Processo infiammatorio**

I **processi infiammatori acuti** compaiono in corso di infezioni, traumi, interventi chirurgici, neoplasie e ustioni.

Essi sono associati all'elevata presenza di proteine della fase acuta che hanno funzione di mediazione (PCR, C3), di immuno-regolazione (PCR,  $\alpha$ 1-glicoproteina acida), di inibizione ( $\alpha$ 1-antitripsina, aptoglobina), di ricostruzione ( $\alpha$ 1-glicoproteina,  $\alpha$ 1-antitripsina) e di rimozione dei prodotti infiammatori (aptoglobina) [81].

In genere sono accompagnati da un rilevante aumento dell'aptoglobina e talora della alfa 1 anti-tripsina, con relativa diminuzione dell'albumina.

## **Cos'è la componente monoclonale**

Si tratta di un'immunoglobulina secreta da un singolo clone di cellule B in espansione, che viene rilevata nel tracciato elettroforetico sierico o urinario come un'unica proteina, in grado di migrare in una zona specifica del tracciato [82].

L'elettroforesi consente di rilevare l'omogeneità molecolare della proteina e di quantificarla.

Le tecniche di immunofissazione e/o di immunosottrazione consentono di tipizzare la proteina in maniera immunologica, in modo tale da specificare il tipo di catena (pesante e leggera) che la compongono [83].

La presenza di una componente monoclonale definisce la condizione clinica di gammopatia monoclonale; tuttavia l'assenza di componente monoclonale nel siero e/o nelle urine non esclude la condizione clinica di gammopatia monoclonale [84].

## **Quantificazione della componente monoclonale**

La quantificazione della componente monoclonale è un **indice della massa tumorale** in tutte le malattie secernenti.

Il modo più corretto di misurare la componente monoclonale sierica è per proporzione diretta con la concentrazione delle proteine totali sieriche dopo delimitazione del picco monoclonale nel tracciato elettroforetico [85].

## **Immunofissazione**

In seguito all'identificazione della componente monoclonale, è necessario effettuare un'ulteriore indagine mediante una tecnica immunologica detta **immunofissazione** allo scopo di stabilire, caratterizzare e quantificare a quale isotipo appartiene la componente monoclonale e la catena leggera correlata (immunotipizzazione).

L'immunofissazione può essere effettuata mediante **fissazione su gel di agarosio** o mediante **immunosottrazione in elettroforesi capillare** [86].

L'immunosottrazione è un test che utilizza antisieri per rimuovere selettivamente i vari tipi di immunoglobuline.

L'immunofissazione e l'immunosottrazione sono dei test utili per identificare le bande anomale individuate mediante l'analisi elettroforetica delle proteine.

Sono test di secondo livello utili alla valutazione dell'effettiva produzione di componente monoclonale da parte del paziente, perché possono esserci delle componenti "ingannevoli" dovute all'utilizzo di farmaci di contrasto (utilizzati in radiologia) e a terapie con anticorpi monoclonali di classe IgG. Nella maggior parte dei casi vengono utilizzate per caratterizzare e quantificare le proteine della zona gamma.

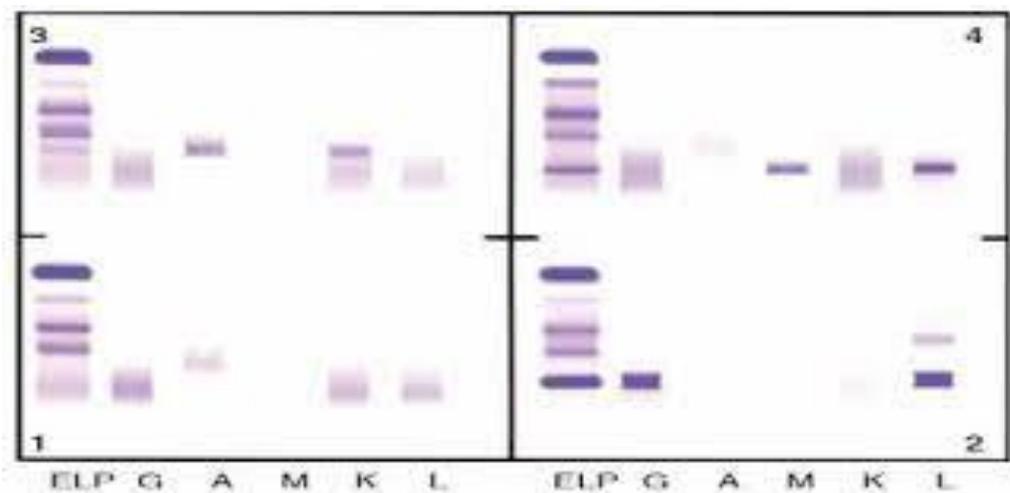
Entrambi i test sono utilizzati per valutare **possibili alterazioni nella produzione di immunoglobuline** [87].

I risultati di tali test permetteranno al medico curante di effettuare una **prima valutazione diagnostica** e di valutare il rischio di sviluppare una malattia conclamata.

Nel caso in cui il laboratorio non sia in grado di condurre test aggiuntivi in modo indipendente, deve allegare al rapporto un commento interpretativo in cui viene delineato in dettaglio il percorso diagnostico ottimale [88].

In seguito all'individuazione di una componente monoclonale con quantificazione e tipizzazione, il medico responsabile della cura decide, in base alle informazioni cliniche a sua disposizione, se richiedere ulteriori test per valutare potenziali fattori di rischio per la progressione del mieloma multiplo e/o diagnosticare eventuali danni agli organi (CRAB: calcio elevato nel sangue, insufficienza renale, anemia, lesioni ossee) [89].

Mediante l'utilizzo dell'immunofissazione su gel di agarosio è possibile individuare componenti monoclonali fino a 0.1 g/dl [90].



*Immagine 11* [91]

## **Bence Jones Ouchterlony**

La **proteina di Bence Jones** (PBJ) rappresenta il primo indicatore tumorale misurabile in un laboratorio clinico, utilizzato per pazienti colpiti da mieloma multiplo.

La sua scoperta risale al **1845**, quando il medico inglese Henry Bence Jones la descrisse per la prima volta. Successivamente fu identificata come una catena leggera monoclonale immunoglobulinica libera [92].

La diagnosi di proteinuria di Bence Jones è stabilita dalla rilevazione di **catene leggere monoclonali** di immunoglobuline nelle **urine**.

Comunemente si ricerca la presenza di PBJ attraverso l'elettroforesi delle proteine urinarie seguita, nei casi positivi, dall'immunofissazione urinaria [93].

Attualmente la proteina di Bence Jones e le altre componenti monoclonali sono riconosciute come **fondamentali marcatori proteici** per la diagnosi, la classificazione, la stadiazione e il monitoraggio delle alterazioni plasmacellulari [94].

La presenza della componente monoclonale può essere rapidamente identificata mediante un picco simmetrico omogeneo di alta intensità, con mobilità elettroforetica di tipo  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  nel siero o nelle urine.

La proteinuria di Bence Jones deve essere richiesta quando si sospetta una **disfunzione plasmacellulare** e la sua ricerca è essenziale quando si individua una componente monoclonale nel siero [95].

Per individuare la presenza di catene leggere monoclonali libere, il metodo di riferimento è l'**immuno-elettroforesi delle urine** (U-IFE), che permette di distinguere le catene leggere monoclonali dalle catene leggere associate alle catene pesanti.

Affiancata all'elettroforesi capillare ci sono l'immunofissazione su siero, l'immunofissazione su urine e la ricerca delle proteine di Bence Jones.

Quest'ultima aiuta nella diagnosi e il metodo utilizzato è quello dell'immunodiffusione radiale secondo la **tecnica Ouchterlony**.

### **Principio del test**

L'antigene e l'anticorpo, depositi in due pozzetti differenti del gel di agar, diffondendo creano un gradiente di concentrazione all'interno del gel stesso.

Nel punto compreso tra i due pozzetti in cui i due reagenti hanno la medesima concentrazione si ha la formazione di una **banda di immunoprecipitazione**.

Il test determina le catene leggere totali (legate e libere).

### **Campioni**

Il campione utilizzato è l'**urina**. La sua stabilità è di 7 giorni a 2-8°C o 2 mesi a -18°C

### **Reagenti**

- **Piastra**: gel di agarosio 0.9%; tampone Tris 50 mM pH 7.4; colorante; PEG 6000 3%.
- **Antisiero Kappa**: antisiero di capra anti Catene Kappa libere e legate; tampone Tris 50 mM pH 7.4; stabilizzanti e conservanti.
- **Antisiero Lambda**: antisiero di capra anti Catene Lambda libere e legate; tampone Tris 50 mM pH 7.4; stabilizzanti e conservanti.
- **Controllo Positivo**: soluzione stabilizzata, a base umana, di Catene Kappa e Catene Lambda libere e legate.

## **Preparazione dei reagenti**

Tutti i reagenti sono pronti all'uso.

Stabilità: fino alla data di scadenza indicata sulla confezione conservati a 2-8°C.

## **Materiali necessari non forniti**

Micropipette da 10-40µl; incubatore 37°C; normale strumentazione di laboratorio.

## **Precauzioni**

Il reagente può contenere componenti non reattivi e conservanti di varia natura. A scopo cautelativo è comunque opportuno evitare il contatto con la pelle e l'ingestione.

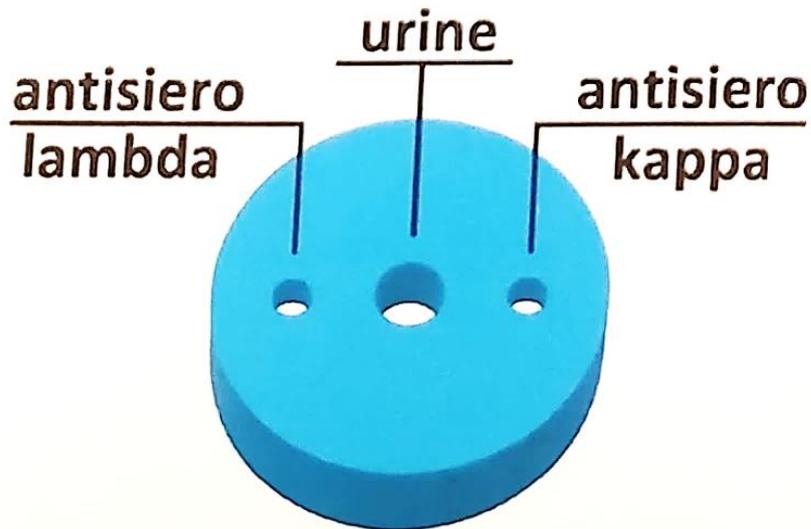
Utilizzare le normali precauzioni previste per il comportamento in laboratorio.

## **Procedimento**

Portare i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente.

Aprire la piastrina ed eventualmente attendere l'evaporazione della condensa presente nei pozzetti, identificare sul fondo della piastrina con un pennarello indelebile uno dei pozzetti laterali, nel quale sarà deposto sempre lo stesso tipo di antisiero, dispensare 40 µl di urina nel pozzetto centrale, 10 µl di antisiero Kappa in un pozzetto laterale e 10 µl di antisiero Lambda nel pozzetto laterale libero. Incubare in camera umida a 37° C.

Dopo 6-9 ore è possibile valutare campioni ad alto titolo di proteinuria di Bence Jones, mentre per campioni a concentrazioni inferiori ciò è possibile solo dopo 9-15 ore [96].



*Immagine 12* [97]

### **Interpretazione dei risultati**

L'**assenza** di immunoprecipitati di **ambidue** le catene esclude categoricamente la presenza di Bence Jones.

La **presenza** di immunoprecipitati tra il pozzetto del campione e il pozzetto dell'antisiero Kappa indica la presenza nel campione di catene Kappa.

La **presenza** di immunoprecipitati tra il pozzetto del campione e il pozzetto dell'antisiero Lambda indica la presenza nel campione di catene Lambda.

Sia le catene Kappa che le catene Lambda presenti potrebbero essere policlonali, quindi dare un risultato negativo all'immunofissazione.

È possibile valutare indicativamente la concentrazione del campione osservando la posizione della banda; infatti se essa sarà vicina al pozzetto in cui è stato depositato l'antisiero la concentrazione del campione sarà alta, al contrario se la banda sarà vicina al pozzetto dell'urina la concentrazione sarà bassa [98].



*Immagine 13*

### Calibrazione

I kit sono forniti di Controllo Positivo.

### Prestazioni del test

nella serie (n= 60)	+	-
Bence Jones LTA	20	40
Test concorrenza	20	40

*Immagine 14* [99]

### Limite di rilevabilità

La sensibilità del metodo è pari a 5 mg/dl per le catene Kappa e 5 mg/dl per le catene Lambda.

## Considerazioni sullo smaltimento

Il prodotto è destinato all'utilizzo all'interno di laboratori di analisi professionali. Per un corretto smaltimento dei rifiuti fare riferimento alla normativa vigente e alle schede informative in materia di sicurezza.

## Intervalli di riferimento

Gli analiti ricercati devono essere assenti o ad una concentrazione inferiore al cut-off delle analisi.

Per la proteinuria di Bence Jones solo ai fini contrastografici viene generalmente riconosciuto un cut-off pari a 50 mg/dl, è comunque consigliabile che ogni laboratorio determini il proprio valore di cut-off.

## Confezioni

<b>CODICE UK 01000</b>	<b>(15 TEST)</b>
Piastre per doppia immunodiffusione	15
Antisiero Kappa	1 x 350 µl
Antisiero Lambda	1 x 350 µl
Controllo Positivo	1 x 100 µl

<b>CODICE UK 01001</b>	<b>(10 TEST)</b>
Piastre per doppia immunodiffusione	10
Antisiero Kappa	1 x 300 µl
Antisiero Lambda	1 x 300 µl
Controllo Positivo	1 x 100 µl

<b>CODICE UK 01004</b>	<b>(20 TEST)</b>
Piastre per doppia immunodiffusione	20
Antisiero Kappa	1 x 500 µl
Antisiero Lambda	1 x 500 µl
Controllo Positivo	1 x 100 µl

La casa produttrice è la LTA S.r.l.

## Materiali e metodi

Presso il laboratorio analisi **Medical Srl** per la valutazione delle proteine totali e l'analisi elettroforetica sono stati utilizzati i seguenti strumenti:

- 1) Lo strumento **MINICAP FLEX-PIERCING** della casa produttrice **Sebia** (fornitore principale a livello globale di strumenti e reattivi per l'elettroforesi proteica). Viene utilizzato per l'elettroforesi capillare **automatica**.

Si tratta di uno strumento multi-metodica in grado di fornire elettroforesi utili ad una gamma di analisi su urine, siero e globuli rossi come immunotipizzazione, proteine, emoglobine e CDT (Carbohydrate Deficient Transferrin), utilizzato per la medicina del lavoro.

Ha un peso di 30 kg e dimensioni 43x57x41cm.

Consta di 2 capillari in silice, ognuno per una migrazione simultanea.

Vengono utilizzate per l'analisi elettroforetica delle **provette da siero** con gel separatore e attivatore di coagulazione.

Lo strumento permette l'effettuazione di un test totalmente automatico per l'analisi quantitativa o qualitativa delle proteine sieriche mediante separazioni rapide, a elevata risoluzione.

Si ha la visualizzazione **diretta** del profilo elettroforetico al fine di ottenere uno screening nel minor tempo possibile e per l'identificazione di profili alterati.

Il test si basa sulla separazione delle proteine sieriche all'interno di capillari in **silice**, in condizioni di alta tensione e in **tampone basico** in base al flusso elettrosmotico (costituisce il flusso più importante di liquido nel capillare, ed è dovuto alla presenza della carica superficiale sulla parete interna del capillare) e alla mobilità elettroforetica delle proteine sieriche stesse.

Le proteine del siero vengo rilevate durante la migrazione mediante assorbanza UV a 214 nm e quantizzate [100].

La proteina monoclonale può essere rilevata ad una concentrazione fino a 19 mg/dl. Al variare della mobilità delle proteine monoclonali e del fondo policlonale, la sensibilità può subire delle variazioni.

Il MINICAP è in grado di analizzare fino a **20** campioni all'ora.



*Immagine 15* [101]

2) L'analizzatore di chimica clinica **AU680** è fondamentale all'interno del laboratorio perché misura le **proteine totali**, per poi essere valutate dal MINICAP SEBIA per l'analisi elettroforetica [102].



*Immagine 16* [103]

L'elettroforesi siero proteica è associata al dosaggio delle proteine totali, effettuato in chimica clinica, noto come **protidemia totale**.

Il MINICAP riceve dall'AU 680 (analizzatore di chimica clinica) le proteine totali per avere non solo la percentuale, ma anche il valore assoluto stimato nelle varie zone, poiché è **necessario conoscere le proteine totali**.

Questo perché l'elettroforesi fornisce un tracciato che viene letto da un lettore a scanner e trasformato in percentuale. Si ottiene quindi un risultato semiquantitativo, per avere un risultato quantitativo è necessario rapportare la percentuale al totale delle proteine per avere il dosaggio singolo e del picco monoclonale.

Il risultato ottenuto è in **g/dl**.

### **Quesiti di ricerca**

Sono stati formulati i seguenti quesiti per la ricerca:

1. Quali sono le evidenze disponibili sulle patologie monoclonali?
2. Quali sono le incidenze di gammopatie monoclonali in pazienti non ospedalizzati?
3. Quali sono i fattori di rischio maggiormente osservabili in soggetti affetti da patologie monoclonali?
4. Quali tipologie di accertamenti diagnostici sono utilizzati nel porre diagnosi di patologie monoclonali, con maggiore accuratezza diagnostica, per tipologia di organo-apparato coinvolto?

### **Strategia di ricerca**

I database biomedici oggetto di indagine sono stati: PubMed, National Library of Medicine, Ovid Embase...

Le ricerche bibliografiche sono state eseguite tra il mese di settembre 2023 e il mese di giugno 2024.

Sono state usate le seguenti parole chiave nelle ricerche nelle banche dati biomediche: *elettroforesi capillare, proteine plasmatiche, composizione del tracciato elettroforetico, immunofissazione, proteine di Bence Jones, anticorpi, immunoglobuline, gammopatie monoclonali, gammopatie policlonali, mieloma multiplo, MGUS, macroglobulinemia di Waldenström.*

Tali parole chiavi libere o MeSH (Medical Subject Headings), laddove disponibili, sono state combinate tra di loro in diversi modi, attraverso l'utilizzo di operatori booleani con l'obiettivo di ottenere il materiale più completo ed inerente possibile.

Successivamente, un'analisi individuale degli abstract e dei titoli ha permesso una selezione degli articoli più rilevanti e completi, in relazione ai quesiti di ricerca considerati.

### **Analisi statistiche**

Il numero totale dei pazienti appartenenti alla coorte e il numero di pazienti potenzialmente patologici e non patologici, è stato ottenuto analizzando i dati provenienti dal laboratorio analisi ed esaminati in modo descrittivo.

## Risultati

Questa sezione presenta i risultati derivanti dall'analisi delle possibili gammopatie monoclonali, focalizzandosi sui dati ottenuti dalle analisi di elettroforesi capillare e di immunofissazione elettroforetica.

I risultati sono organizzati in base ai parametri principali considerati nello studio, compresi la rilevazione di picchi monoclonali, la quantità e la tipizzazione delle immunoglobuline e le variazioni nel profilo proteico.

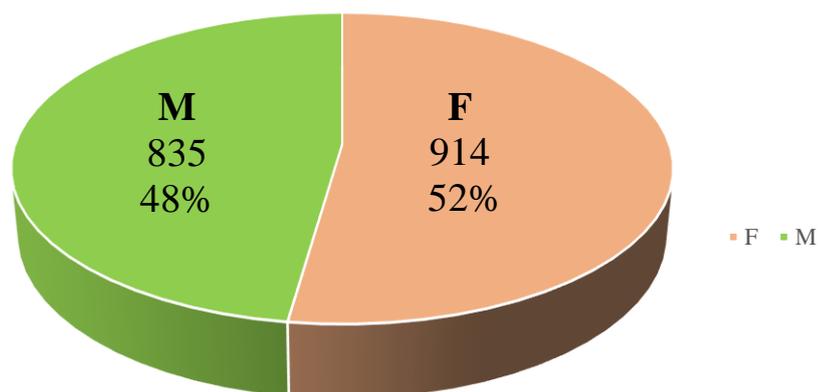
### Statistiche generali sulla popolazione dello studio

Nel presente studio di ricerca sono stati inclusi 1749 pazienti, di cui **914** donne e **835** uomini.

I campioni erano distribuiti pressoché uniformemente tra pazienti di sesso maschile e femminile.

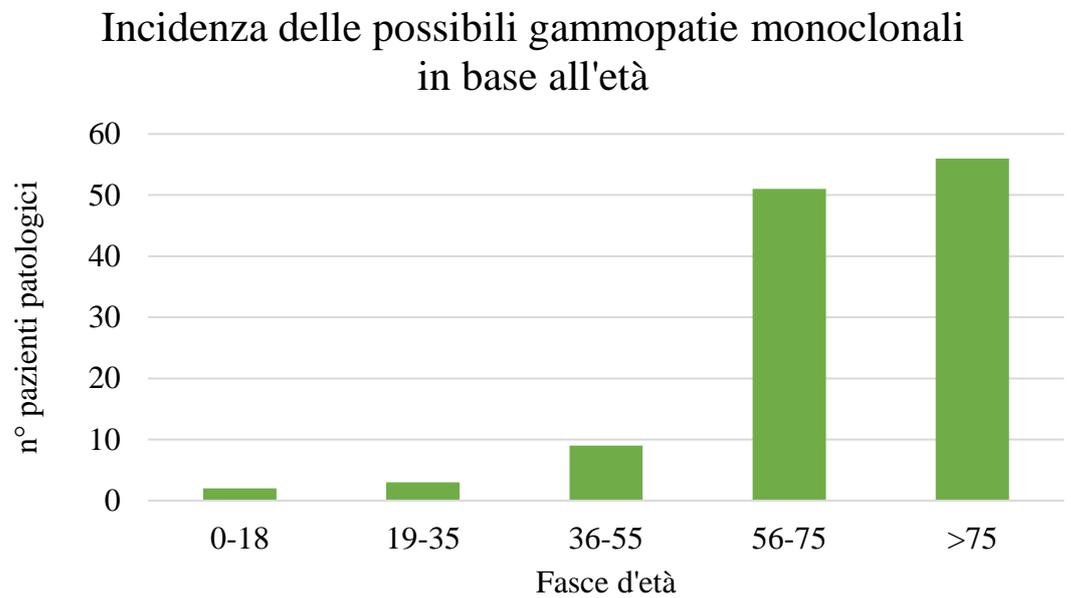
L'età della coorte è compresa tra 4 e 97 anni e l'età media è stata di **60** anni.

#### Distribuzione pazienti in base al sesso



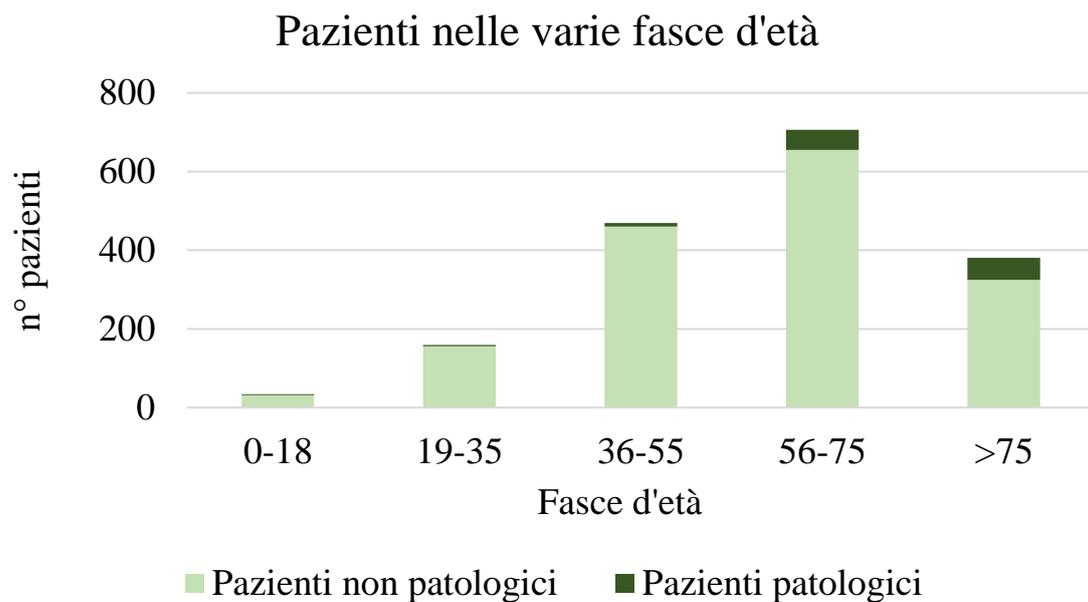
*Immagine 17* - Distribuzione pazienti in base al sesso

Il grafico e la tabella sottostanti mostrano la suddivisione dei pazienti patologici e non patologici, in cinque diverse fasce d'età.

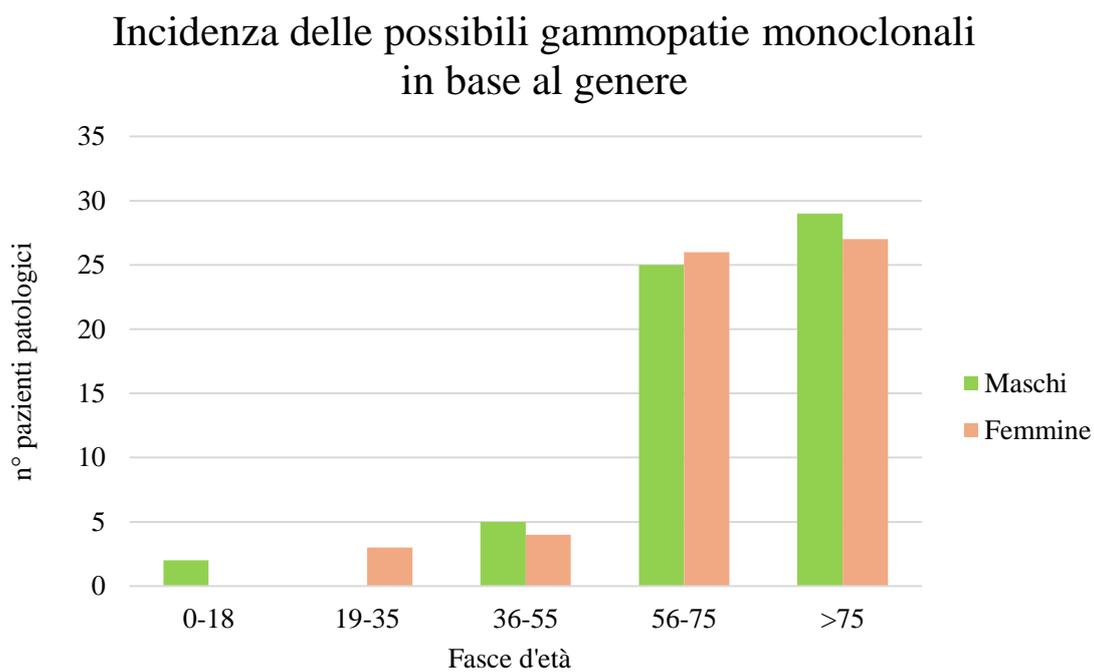


**Immagine 18** - Incidenza delle possibili gammopatie monoclonali in base all'età

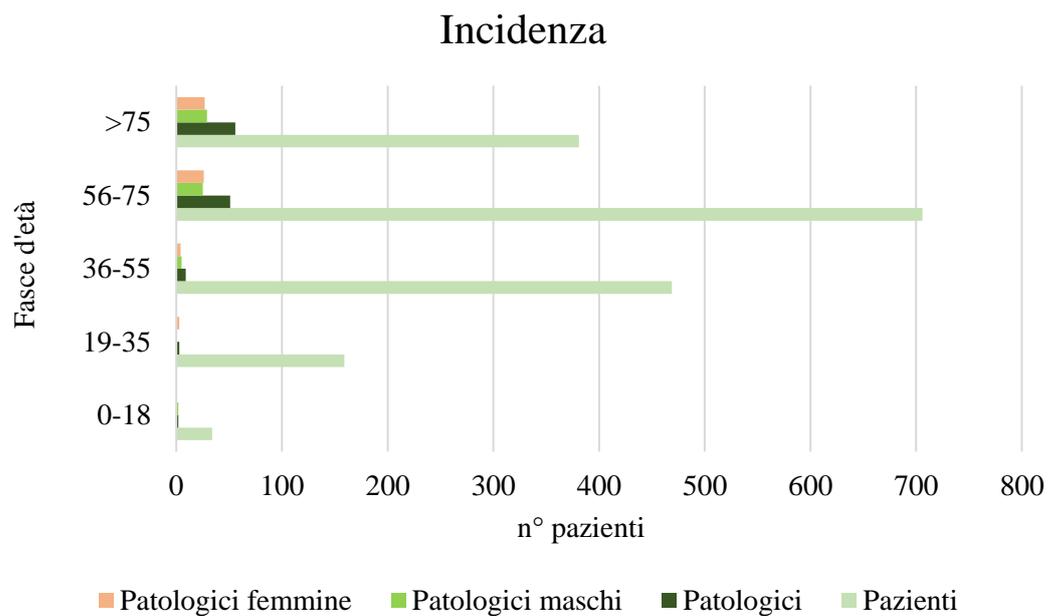
	<b>0-18</b>	<b>19-35</b>	<b>36-55</b>	<b>56-75</b>	<b>&gt;75</b>
<b>Pazienti</b>	34	159	469	706	381
<b>Patologici</b>	2	3	9	51	56
<b>Patologici maschi</b>	2	0	5	25	29
<b>Patologici femmine</b>	0	3	4	26	27



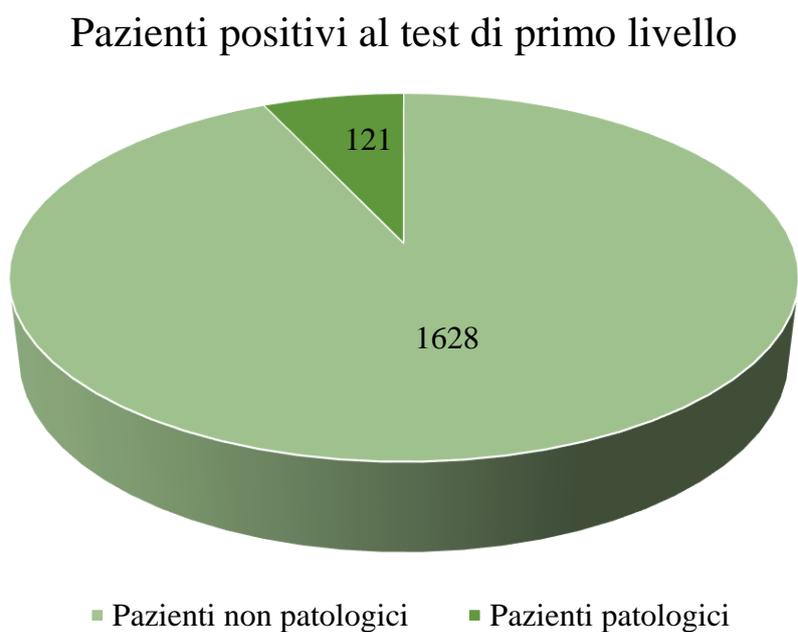
**Immagine 19** - Pazienti nelle varie fasce d'età



**Immagine 20** - Incidenza delle possibili gammopatie monoclonali in base al genere



**Immagine 21** – Incidenza



**Immagine 22** - Pazienti positivi al test di primo livello

Sono state individuate 37 presenze di proteine omogenee, di cui 35 in zona gamma e 2 sia in zona gamma e in beta 2.

Il totale delle presenze rappresenta il **2.11%** della popolazione analizzata.

Queste 37 presenze sono state riscontrate in 21 uomini e 16 donne.

Per quanto riguarda gli uomini l'età media è di 73 anni, mentre le donne hanno un'età media pari a 70 anni.

Inoltre, sono state individuate **84 possibili presenze** di proteine omogenee in zona gamma.

Il totale delle possibili presenze rappresenta il **4.80%** della popolazione analizzata.

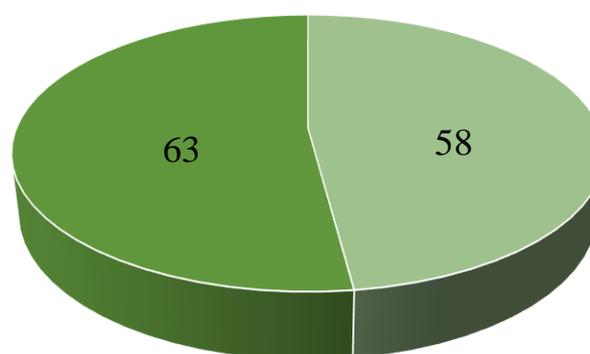
Al fine clinico presenze e possibili presenze vengono considerate come **equivalenti** facendo parte dei positivi al primo livello di analisi.

Il totale complessivo dei pazienti patologici (presenze e possibili presenze) rappresenta il **6.92%** della coorte.

Di queste **121** positività al primo livello (37 presenze e 84 possibili presenze) un certo numero viene perso durante l'iter diagnostico per svariati motivi:

- vengono svolti degli approfondimenti di altra natura;
- alcuni pazienti si affidano al sistema sanitario nazionale (costi minori rispetto ad un laboratorio privato);
- possono esserci dei pazienti non complianti, i quali rifiutano di proseguire le indagini diagnostiche;
- ridotto tempo a disposizione per poter seguire il paziente;
- il medico può valutare che la possibile positività indicata dal laboratorio sia troppo ridotta per giustificare un approfondimento di secondo livello, senza indagare ulteriormente, monitorando l'andamento della patologia nei mesi successivi, ripetendo le analisi [104].

## Pazienti e iter diagnostico

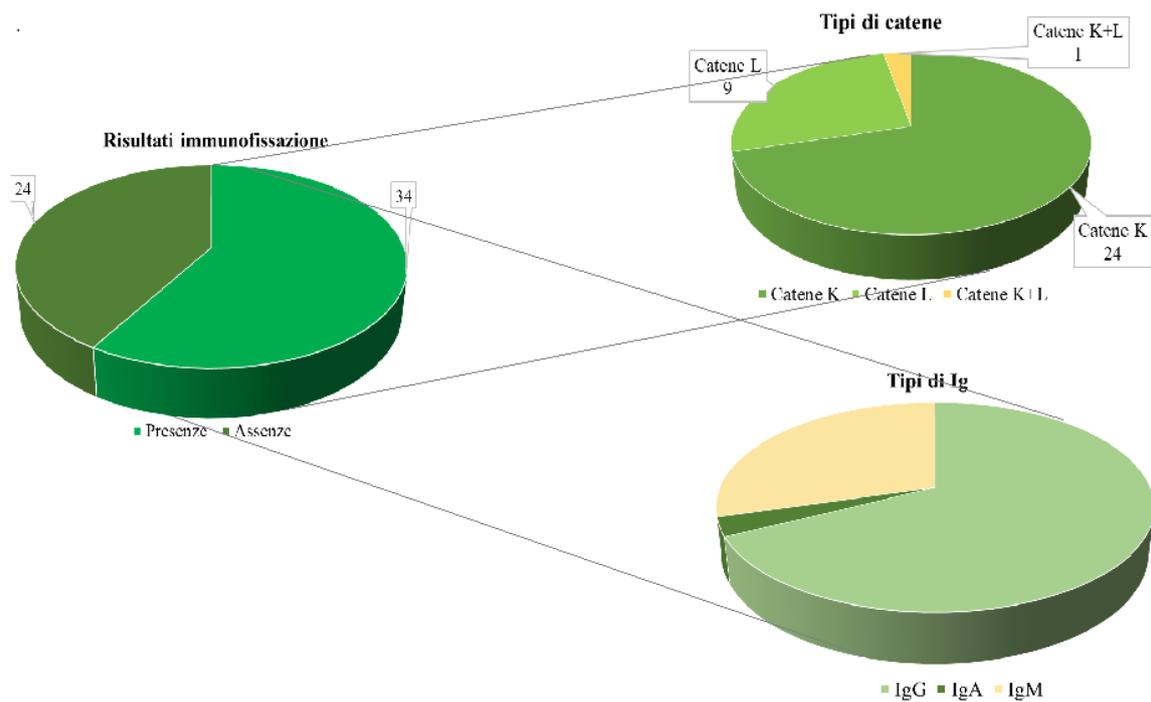


- Immunofissazioni
- Pazienti che non hanno proseguito l'iter diagnostico

Immagine 23 – Pazienti e iter diagnostico

Il totale dei pazienti che hanno effettuato immunofissazione in seguito alla positività del test di primo livello rappresenta il **47.93%** della popolazione studiata.

È possibile osservare la quasi omogenea distribuzione tra i pazienti che hanno effettuato il test di primo livello (elettroforesi) e poi il test di secondo livello (immunofissazione) e i pazienti che non hanno approfondito la determinazione della componente monoclonale.



**Immagine 24** - Caratteristiche pazienti test di secondo livello

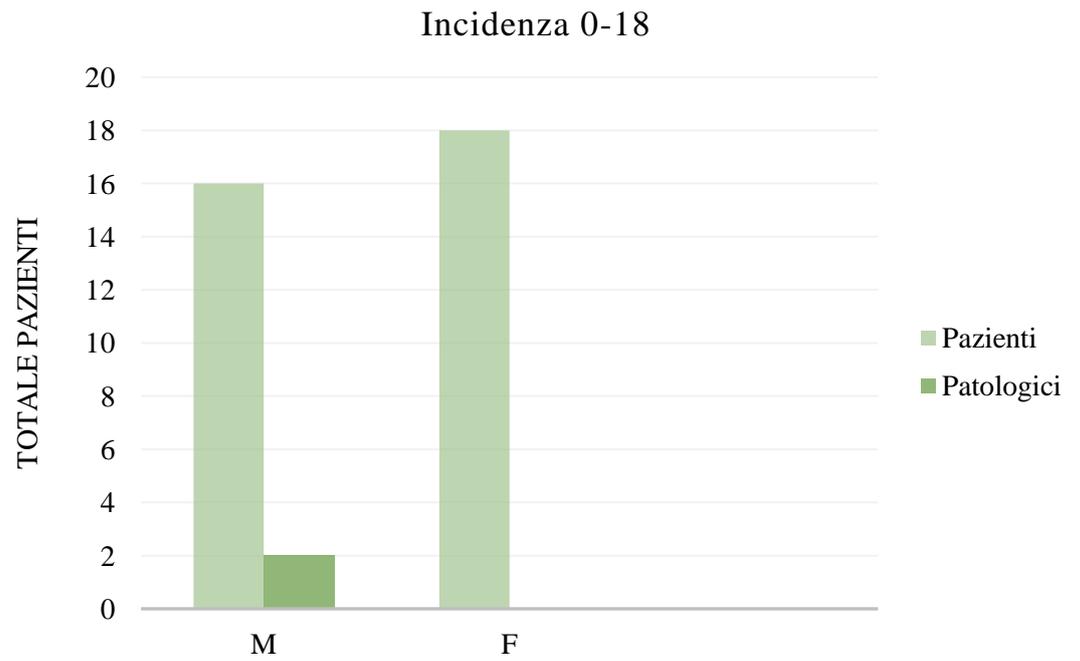
Il totale dei pazienti che hanno effettuato l'immunofissazione è di **58** pazienti, di cui 30 uomini e 28 donne, di cui: **24** catene kappa, **9** catene lambda e **1** presenza di kappa e lambda.

Le IgG totali sono 23, le IgM sono 10 e vi è la presenza di un'unica IgA.

Le assenze di componente monoclonali sono 24 (il **41%** delle immunofissazioni totali).

Nei **34** pazienti appartenenti alla fascia d'età **0-18** sono state riscontrate **2** presenze di proteine omogene

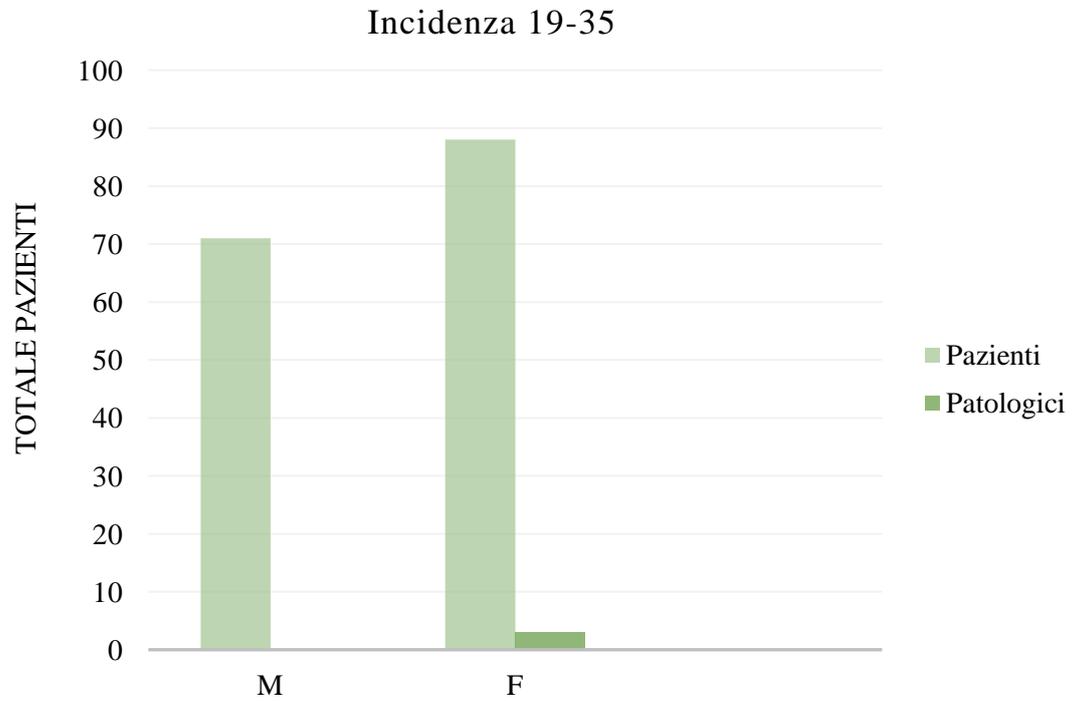
Queste 2 presenze sono state riscontrate in 2 maschi, pari al 12.5 % del gruppo.



*Immagine 25*

Nei **159** pazienti appartenenti alla fascia d'età **18-35** sono state riscontrate **3** presenze di proteine omogene

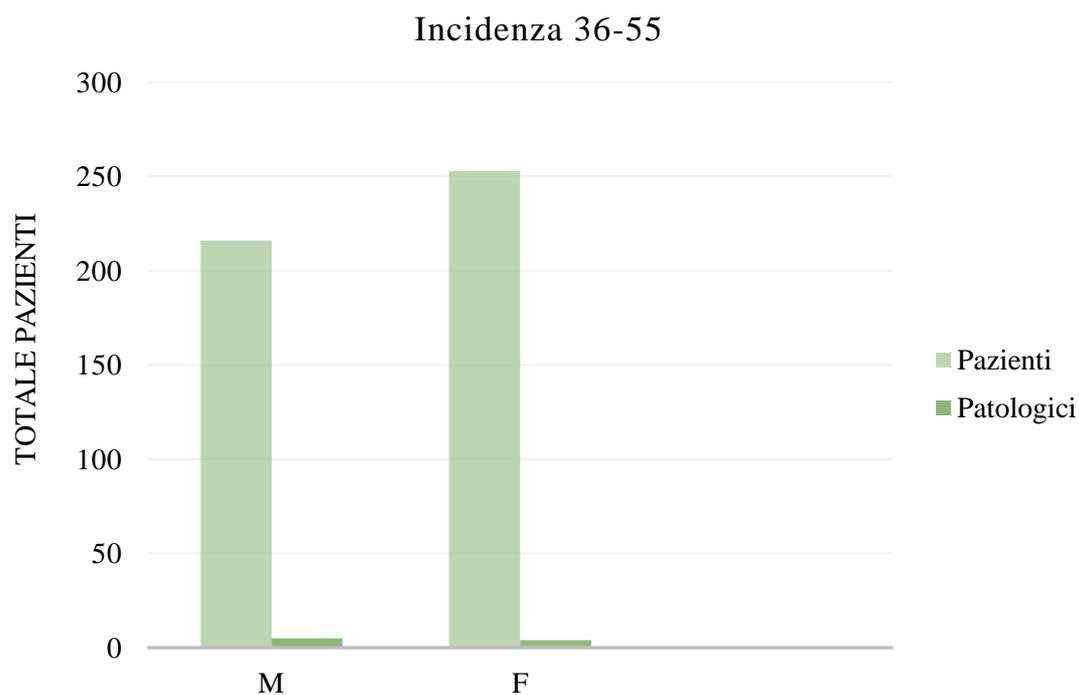
Queste 3 presenze sono state riscontrate in 3 femmine, pari al 4.22 % del gruppo.



*Immagine 26*

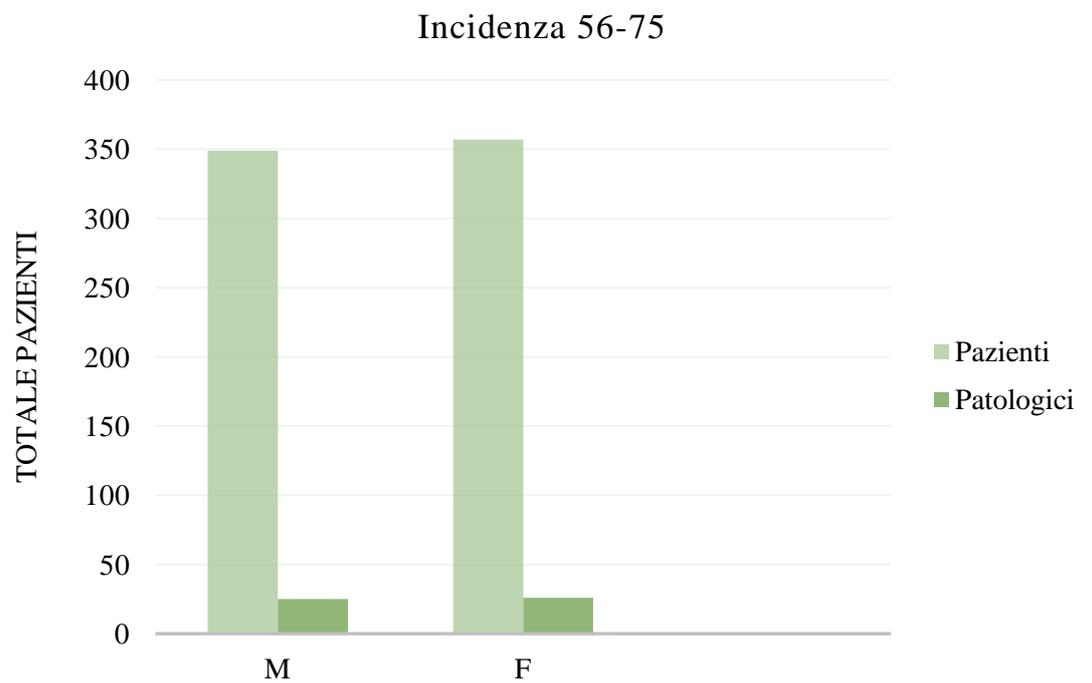
Nei **469** pazienti appartenenti alla fascia d'età **36-55** sono state riscontrate **9** presenze di proteine omogene

Queste 9 presenze sono state riscontrate in 5 maschi e 4 femmine, pari rispettivamente al 2% e 1.85 % del gruppo.



Nei **706** pazienti appartenenti alla fascia d'età **56-75** sono state riscontrate **51** presenze di proteine omogene

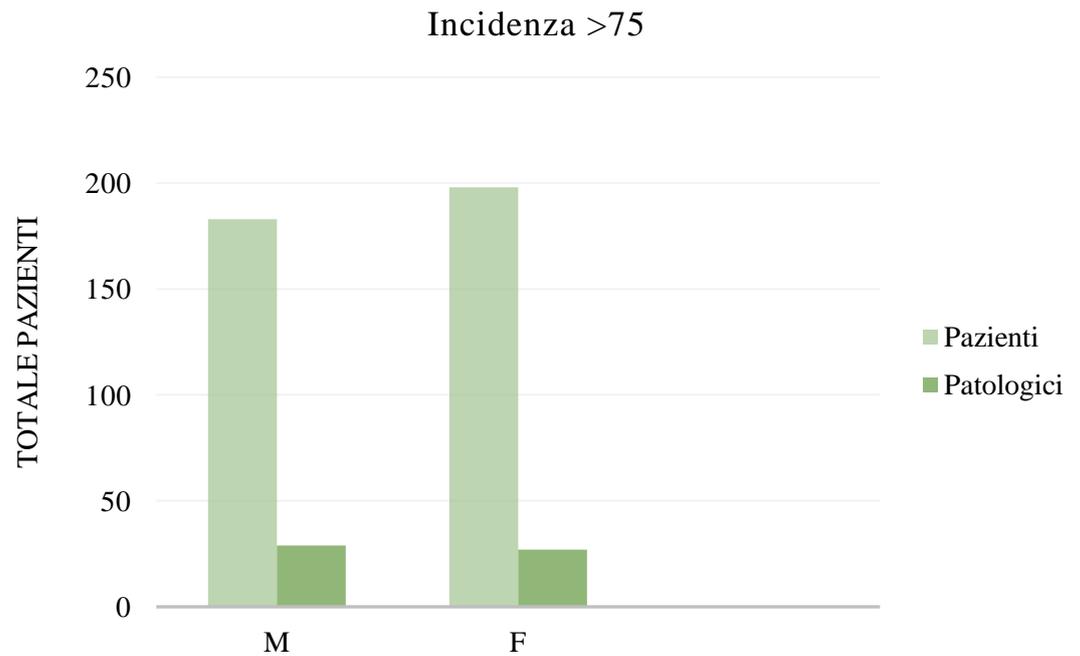
Queste 51 presenze sono state riscontrate in 25 maschi e 26 femmine, pari al 7% in entrambi i gruppi.



***Immagine 28***

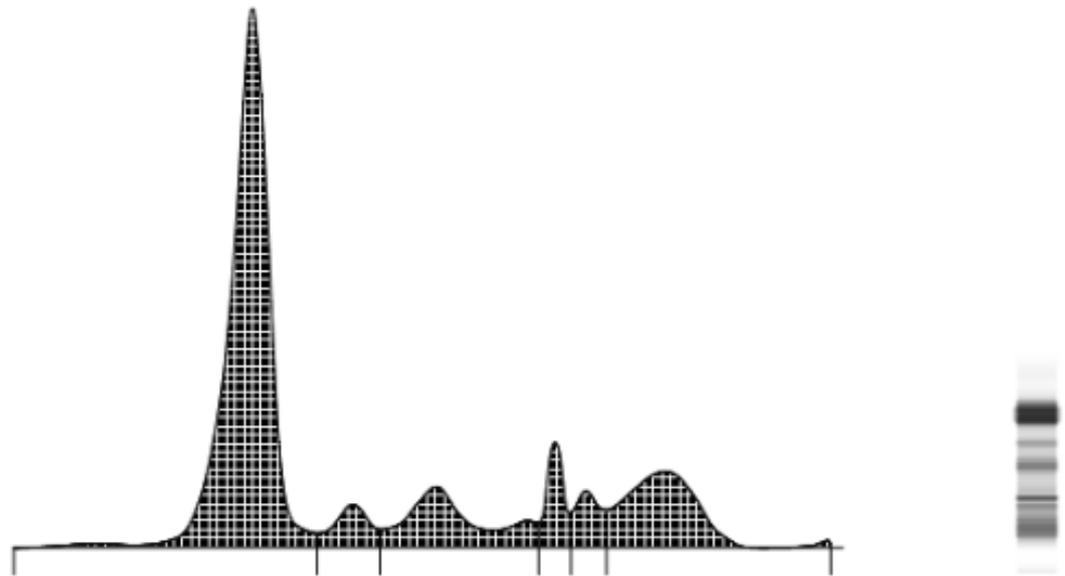
Nei **381** pazienti appartenenti alla fascia d'età **superiore ai 75 anni** sono state riscontrate **56** presenze di proteine omogene

Queste 56 presenze sono state riscontrate in 29 maschi e 27 femmine, pari rispettivamente al 16% e 14 % del gruppo.



***Immagine 29***

## Esempi di tracciati elettroforetici della coorte



### *Serum protein electrophoresis*

Fractions	%	Ref. %	Ref. Conc.
<b>Albumina</b>	<b>59,1</b>	55,8 - 66,1	40,2 - 47,6
<b>Alfa 1</b>	<b>4,3</b>	2,9 - 4,9	2,1 - 3,5
<b>Alfa 2</b>	<b>11,9</b> >	7,1 - 11,8	5,1 - 8,5
<b>Beta 1</b>	<b>5,2</b>	4,7 - 7,2	3,4 - 5,2
<b>Beta 2</b>	<b>4,0</b>	3,2 - 6,5	2,3 - 4,7
<b>Gamma</b>	<b>15,5</b>	11,1 - 18,8	8,0 - 13,5

A/G Ratio:**1,44**

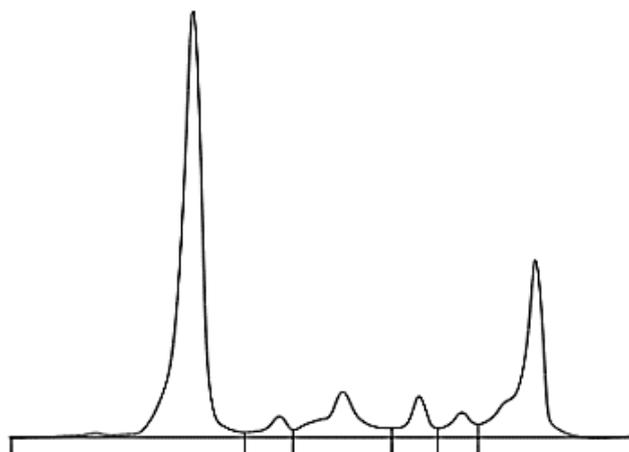
T. P.: g/dL

*Immagine 30* - Paziente appartenente alla coorte con tracciato elettroforetico **non** patologico [105].

Esame	Risultato	U.M.	Valori di Riferimento
-------	-----------	------	-----------------------

**s-ELETTROFORESI PROTEICA**

*Elettroforesi capillare*



ALBUMINA %	55.9	%	54.0 - 66.0
ALFA-1 Globuline %	2.8	%	* 3.0 - 6.0
ALFA-2 Globuline %	9.9	%	7.0 - 10.0
BETA-1 Globuline %	4.7	%	4.7 - 7.2
BETA-2 Globuline %	3.4	%	3.2 - 6.5
GAMMA Globuline %	23.3	%	* 12.0 - 20.0
Rapporto ALBUMINA/GLOBULINE	1.27		1.10 - 2.40
ALBUMINA	4.60	g/dL	3.35 - 4.75
ALFA-1 Globuline	0.20	g/dL	* 0.21 - 0.43
ALFA-2 Globuline	0.80	g/dL	* 0.50 - 0.72
BETA-1 Globuline	0.40	g/dL	0.34 - 0.52
BETA-2 Globuline	0.30	g/dL	0.23 - 0.47
GAMMA Globuline	1.90	g/dL	* 0.86 - 1.44
Commento:			

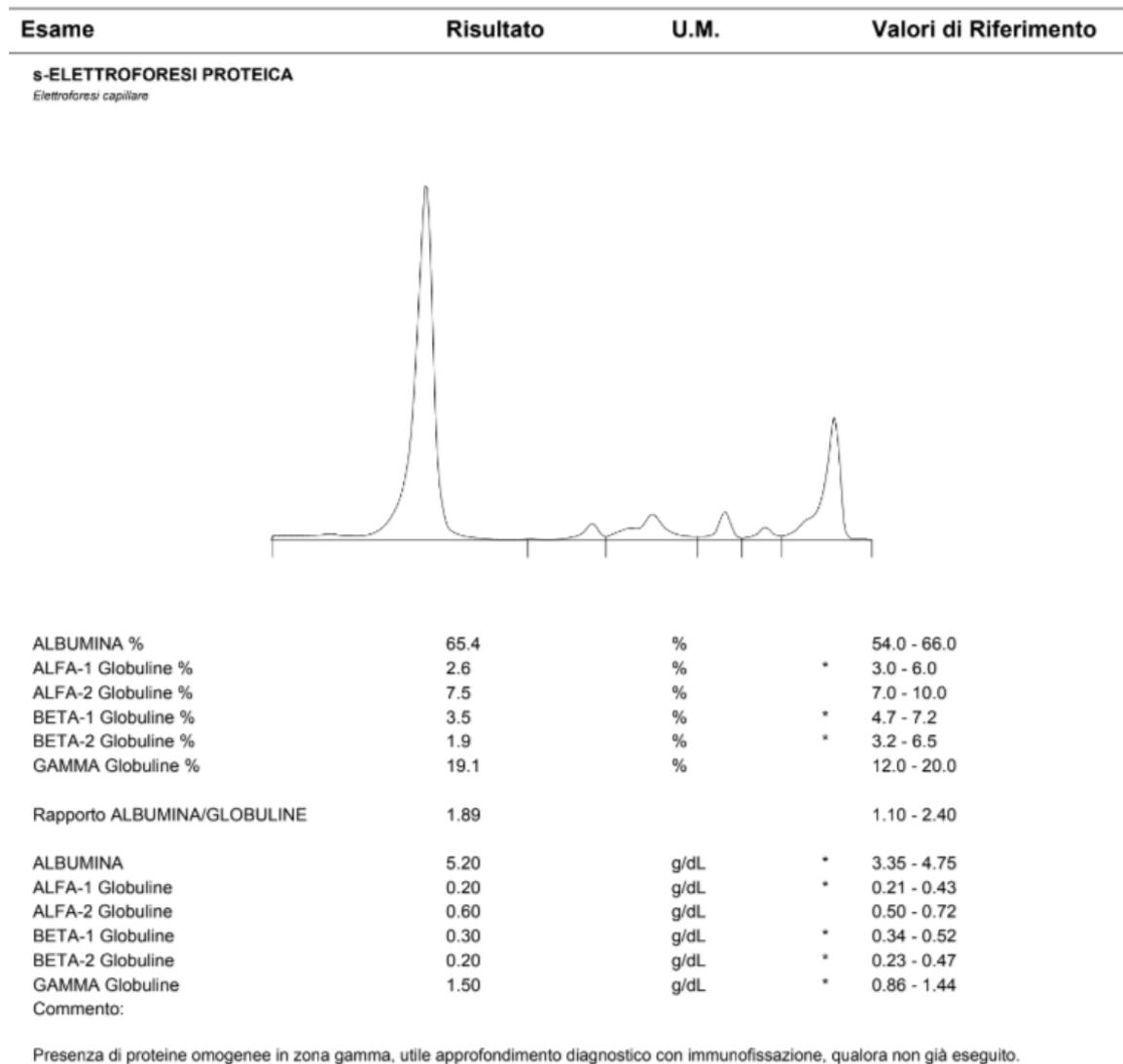
Presenza di proteine omogenee in zona gamma. Utile approfondimento diagnostico con immunofissazione, qualora non già eseguito.

**Immagine 31** - Paziente appartenente alla coorte con tracciato elettroforetico patologico. Possibile diagnosi: macroglobulinemia di Waldenström [106].

Se il picco è particolarmente intenso e migra verso la coda della zona gamma è probabile che si tratti di immunoglobuline di tipo M, quindi alla **macroglobulinemia di Waldenström** [107].

## Caso clinico di progressione a livello della zona gamma

Il paziente numero 1142 appartenente alla coorte ha effettuato tre differenti indagini elettroforetiche nell'arco di 14 mesi: la prima analisi è stata effettuata a gennaio 2023, la seconda è stata effettuata ad agosto 2023 ed infine l'ultima QPE effettuata è di marzo 2024.

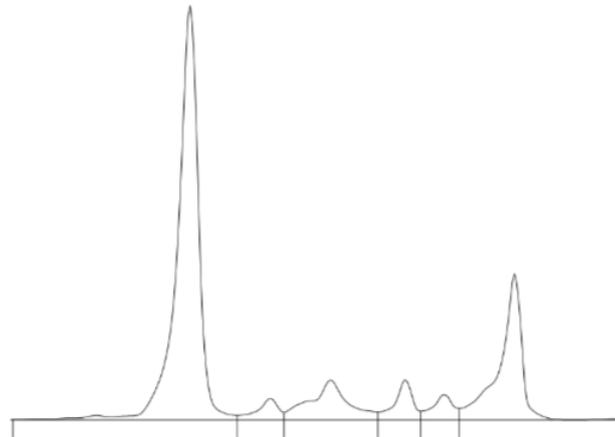


**Immagine 32** - Tracciato elettroforetico gennaio 2023 [108]

Esame	Risultato	U.M.	Valori di Riferimento
-------	-----------	------	-----------------------

**s-ELETTROFORESI PROTEICA**

*Elettroforesi capillare*



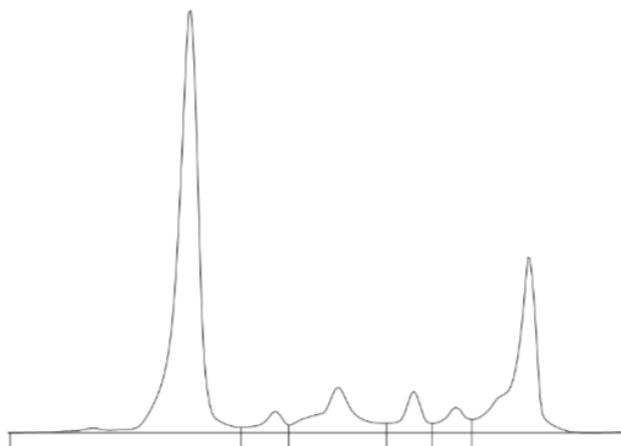
ALBUMINA %	58.0	%	54.0 - 66.0
ALFA-1 Globuline %	3.0	%	3.0 - 6.0
ALFA-2 Globuline %	9.8	%	7.0 - 10.0
BETA-1 Globuline %	4.7	%	4.7 - 7.2
BETA-2 Globuline %	3.5	%	3.2 - 6.5
GAMMA Globuline %	21.0	%	* 12.0 - 20.0
Rapporto ALBUMINA/GLOBULINE	1.38		1.10 - 2.40
ALBUMINA	4.30	g/dL	3.35 - 4.75
ALFA-1 Globuline	0.20	g/dL	* 0.21 - 0.43
ALFA-2 Globuline	0.70	g/dL	0.50 - 0.72
BETA-1 Globuline	0.30	g/dL	* 0.34 - 0.52
BETA-2 Globuline	0.30	g/dL	0.23 - 0.47
GAMMA Globuline	1.60	g/dL	* 0.86 - 1.44
Commento:			

**Immagine 33** - Tracciato elettroforetico agosto 2023 [109]

Esame	Risultato	U.M.	Valori di Riferimento
-------	-----------	------	-----------------------

**s-ELETTROFORESI PROTEICA**

*Elettroforesi capillare*



ALBUMINA %	55.9	%		54.0 - 66.0
ALFA-1 Globuline %	2.8	%	*	3.0 - 6.0
ALFA-2 Globuline %	9.9	%		7.0 - 10.0
BETA-1 Globuline %	4.7	%		4.7 - 7.2
BETA-2 Globuline %	3.4	%		3.2 - 6.5
GAMMA Globuline %	23.3	%	*	12.0 - 20.0
Rapporto ALBUMINA/GLOBULINE	1.27			1.10 - 2.40
ALBUMINA	4.60	g/dL		3.35 - 4.75
ALFA-1 Globuline	0.20	g/dL	*	0.21 - 0.43
ALFA-2 Globuline	0.80	g/dL	*	0.50 - 0.72
BETA-1 Globuline	0.40	g/dL		0.34 - 0.52
BETA-2 Globuline	0.30	g/dL		0.23 - 0.47
GAMMA Globuline	1.90	g/dL	*	0.86 - 1.44
Commento:				

**Immagine 34** - Tracciato elettroforetico marzo 2024 [110]

Come evidenziato graficamente, è possibile notare la progressione percentuale di gamma globuline.

È da notare l'impossibilità di effettuare una diagnosi a questo livello di iter diagnostico in quanto il paziente potrebbe non presentare una progressione a soggetto patologico, oppure potrebbe far parte della maggioranza dei pazienti a cui è diagnosticato un disordine ematologico e avere una diagnosi di gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS), la quale rappresenta statisticamente la percentuale più ampia in caso di malattia diagnosticata.

Oltre alle MGUS, nell'ipotesi più infausta, potrebbe trattarsi di un possibile tumore ematico come mieloma multiplo, tumori non solidi, macroglobulinemia di Waldenström...

### **Fattori di rischio nelle gammopatie monoclonali**

Prevedere la progressione delle gammopatie monoclonali è una sfida impegnativa al momento della diagnosi iniziale.

Vi sono alcuni indicatori, come la **tipologia di proteina monoclonale**, la **dimensione** e il **rapporto delle catene leggere libere**, che permettono di identificare pazienti con un rischio maggiore di progressione della malattia [111, 112].

Inoltre, i medici dovrebbero essere consapevoli che condizioni come l'insufficienza renale, l'anemia e l'ipercalcemia, possono presentarsi indipendentemente dalla presenza della componente monoclonale [113].

### **Tipologia di immunoglobulina**

Tra i pazienti inclusi nello studio di Kyle et al, i pazienti che presentavano proteine monoclonali di classe IgM o IgA hanno mostrato una probabilità maggiore di progressione della malattia rispetto a coloro con proteine monoclonali di classe IgG.

Diversi studi concordano sulla correlazione positiva tra classe di immunoglobulina e progressione della patologia. [114]

Inoltre, nello studio di Blade et al, è stato riportato che i pazienti diagnosticati con gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS) di classe IgA presentavano un rischio aumentato di sviluppare il mieloma multiplo.

### **Dimensione della proteina monoclonale**

La dimensione della proteina monoclonale nello studio di Kyle et al, è emersa come il principale indicatore prognostico. Infatti, secondo i risultati dello studio, la probabilità di transizione verso il mieloma multiplo entro vent'anni dalla diagnosi di MGUS era del 49% per gli individui con un livello iniziale di componente monoclonale di 25g/l, a fronte di un modesto 14% per coloro il cui livello di proteina monoclonale iniziale era < 5g/l.

É rilevante notare come il rischio di progressione per i pazienti con un livello di proteina monoclonale di 15g/l raddoppiava rispetto a quelli con valori iniziali pari a 5g/l [115]. Inoltre, i pazienti con livelli di 25g/l presentavano rischi anche di 5 volte superiore rispetto a pazienti con valori inferiori a 5g/l.

### **Rapporto delle catene leggere libere**

Nella coorte analizzata da Kyle et al, dei 1148 pazienti diagnosticati con MGUS, circa un terzo presentava un rapporto delle catene leggere libere anormale al momento della diagnosi.

Tali pazienti avevano un rischio significativamente elevato di progressione della malattia rispetto a quelli con un rapporto delle catene leggere fisiologico.

Questa associazione del rischio è rimasta costante indipendentemente dalla dimensione o dalla tipologia di proteina monoclonale sierica rilevata [116].

## Discussione

### Sintesi dei risultati

Negli studi analizzati si è osservato che i valori di prevalenza delle gammopatie monoclonali sono molto simili a quelli riscontrati nella coorte.

Quasi la totalità degli studi mostra valori che si aggirano intorno al **3-4%** nei pazienti “**giovani**” mentre, confermando la proporzionalità diretta tra prevalenza ed età, si raggiunge un *plateau* dell’**8-9%** nei pazienti **anziani** [117].

Nel presente studio composto da una coorte di **1749** pazienti si è osservato che i pazienti con età superiore ai 75 anni mostrano una incidenza maggiore di alterazioni del profilo elettroforetico.

È stato possibile evidenziare statisticamente la proporzionalità diretta tra età anagrafica e possibile presenza di gammopatia.

In letteratura vi è generale accordo sulla proporzionalità diretta tra incidenza di disordini ematologici ed età anagrafica.

È probabile dal punto di vista statistico che la maggior parte dei pazienti patologici svilupperà delle gammopatie monoclonali di incerto significato rispetto a mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldenström e altre patologie.

### Criteri di refertazione dei test

Al fine delle indagini svolte, le presenze e possibili presenze vengono equiparate dal laboratorio perciò sono considerate equivalenti.

La **presenza** refertata da parte del laboratorio Medical indica una situazione in cui il quadro elettroforetico è francamente patologico, mentre una **possibile presenza** è rilevata quando c'è il sospetto di una componente monoclonale.

La locuzione **possibile presenza** serve per distinguere i pazienti potenzialmente patologici dai patologici accertati.

Il compito del laboratorista è evidenziare anche minime alterazioni del tracciato elettroforetico, così da segnalarle.

L'obiettivo è comunicare un'anomalia che potrebbe non essere patologicamente rilevante ma comunque da tenere sotto controllo.

Il criterio in un test di screening (elettroforesi) è massimizzare la sensibilità a scapito della specificità (minimizza i falsi negativi a discapito di un aumento dei falsi positivi) [118].

Un test altamente sensibile è preferibile se l'obiettivo è quello di individuare il maggior numero di malati, come nel caso dei test di screening, perché dà meno risultati falsi negativi [119]. Negli screening è necessario identificare tutti i soggetti affetti, anche se questo può significare un aumento di falsi positivi.

Il test di secondo livello (immunofissazione) consente di conoscere la tipologia di catena. Si tratta di un test più costoso perché più preciso: aumenta sensibilità e specificità rispetto al test di screening, sempre favorendo la specificità a discapito della sensibilità.

È importante notare che la presenza di componenti monoclonali aumenta significativamente all'aumentare dell'età, con un'incidenza che è circa quattro volte maggiore negli individui di età superiore agli 80 anni rispetto ai pazienti più giovani.

Una ristretta percentuale dei pazienti affetti da gammopatie monoclonali di incerto significato svilupperà, nel corso della propria vita, un mieloma multiplo: da questo deriva la grande importanza dei **controlli periodici**.

I pazienti affetti da MGUS hanno un rischio aumentato fino a otto volte rispetto alla popolazione generale di sviluppare nel corso del tempo neoplasie del sangue, come la leucemia mieloide acuta, la policitemia vera e le sindromi mielodisplastiche.

Inoltre presentano un rischio circa 1,5 volte maggiore di sviluppare tumori solidi [120].

### **Limiti e punti di forza dello studio**

Uno dei **limiti** dello studio è rappresentato dal numero ridotto di pazienti appartenenti alla coorte, in quanto non può essere rappresentativo dell'intera popolazione.

Altro fattore limitante è dovuto alla durata dello studio, svolto in un periodo di tempo limitato a soli sei mesi, anziché diversi anni come molti altri studi analizzati e citati in questo elaborato. Studi prolungati hanno un valore statistico più rappresentativo di quello illustrato in questa produzione.

Terzo limite è il fatto che la coorte di pazienti analizzata non prevede la presenza di pazienti ospedalizzati e/o già seguiti da un'equipe medica. Questo comporta l'assenza delle eterogeneità riscontrabili in una popolazione ospedaliera.

Per quanto riguarda i **punti di forza** sono da evidenziare l'accuratezza dell'indagine elettroforetica e dell'immunofissazione. Si tratta di metodiche ben strutturate e ampiamente testate, facilmente confrontabili con la maggioranza della letteratura scientifica in quanto i criteri analitici sono tendenzialmente uniformi con la maggior parte degli studi presenti.

### **Confronto con altri studi**

Questo studio sperimentale fornisce un aggiornamento di precedenti tentativi di altri investigatori.

I valori riscontrati nella coorte oggetto dello studio sono in linea con la letteratura indagata [23].

Lo studio effettuato costituisce un tentativo di identificare e valutare studi, per fornire ulteriori prove sull'associazione tra la presenza di gammopatie monoclonali e l'alterazione del profilo elettroforetico.

## Conclusioni

Secondo le indicazioni della Sibioc (**Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica**) è importante segnalare anche le minime componenti monoclonali poiché, anche se di dimensioni ridotte, possono essere responsabili di patologie gravi [121].

Come evidenziato nello studio di Decaux et al [126], le **gammopatie monoclonali** sono un insieme di disordini frequentemente riscontrati nella pratica clinica. In particolare le gammopatie monoclonali di incerto significato rappresentano la maggior parte delle alterazioni ematologiche evidenziate.

È da sottolineare l'importanza dell'interazione attiva tra il laboratorista e il clinico, in quanto una stretta collaborazione tra queste figure consente di definire correttamente quali ulteriori indagini sono necessarie e quali sono superflue al fine di ottenere una diagnosi.

L'elettroforesi siero proteica ha lo scopo di indirizzare il sospetto verso determinate malattie ma l'effettuazione unicamente di questo test **non** permette la formulazione di una diagnosi definitiva [122].

È importante il dosaggio proteico perché l'individuazione precoce di un'alterazione dovuta ad una patologia (come mieloma multiplo, malattia di Waldenström...) consente di trattare il paziente e incrementare la sua aspettativa di vita.

Risulta impossibile consentire a tutta la popolazione, (per esempio imponendo un cut off di età), di sottoporsi a test di primo e secondo livello sia per una questione di recepimento dell'informativa e adesione della popolazione, sia per la gestione dei costi da parte del sistema sanitario nazionale.

Inoltre rimangono ancora dubbi su quale sia l'età ottimale per sottoporsi a questi test di laboratorio e con quale frequenza debbano essere ripetuti.

È fondamentale lo screening più ampio possibile dei pazienti e un monitoraggio medico approfondito nella popolazione colpita da gammopatie monoclonali.

Data la loro frequenza, le strategie diagnostiche e di follow-up dovrebbero essere gratuite o fornite a una tariffa agevolata.

Conoscere l'impatto della malattia e identificare chi è più esposto al rischio di problemi clinici a lungo termine può aiutare nella messa in atto di misure di prevenzione, offrendo alle persone colpite un supporto efficiente da parte della sanità pubblica.

Inoltre faciliterebbe la ricerca futura correlata alle gammopatie monoclonali, per creare e testare terapie migliori e innovative.

È da evidenziare anche l'assenza di uniformità nel refertare e segnalare la presenza di componenti monoclonale [125].

Il crescente utilizzo delle tecniche diagnostiche avanzate e l'invecchiamento della popolazione potrebbero contribuire all'aumento osservato nell'incidenza di alcune patologie ematiche negli ultimi anni.

Vi è inoltre la necessità di ulteriori studi per comprendere a pieno le conseguenze a lungo termine di queste patologie, in modo tale da poter fronteggiare al meglio il carico presente e futuro a livello sanitario [123] [124].

## Bibliografia

- [1] [Online]. Available: 1.  
<https://www.ail.it/informati-sulla-malattia/patologie-ematologiche/ail-mileoma/ail-gammopatia-monoclonale> .
- [2] [Online]. Available:  
<https://www.unife.it/medicina/laboratoriobio-medico/insegnamenti/biochimica-clinica/modulo-di-biochimica-clinica/dispense-biochimica-clinica> .
- [3] [Online]. Available:  
[https://www.treccani.it/enciclopedia/immunoglobulina\\_%28Dizionario-di-Medicina%29/](https://www.treccani.it/enciclopedia/immunoglobulina_%28Dizionario-di-Medicina%29/) .
- [4] [Online]. Available:  
[https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1087075/mod\\_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20IV-tecniche%20immunochemiche%205-5-23.pdf](https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1087075/mod_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20IV-tecniche%20immunochemiche%205-5-23.pdf) .
- [5] [Online]. Available:  
<https://medtriennialisl.campusnet.unito.it/didattica/att/8f3c.0351.file.pdf> .
- [6] [Online]. Available:  
<https://www.sifweb.org/sif-magazine/voci-di-supporto/immunoglobuline> .
- [7] [Online]. Available:  
<https://www.ospedaleniguarda.it/esami-di->

laboratorio/info/70/CATENE-LEGGERE-  
kappa-e-lambda-libere .

- [8] [Online]. Available:  
[https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1087075/mod\\_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20IV-tecniche%20immunochemiche%205-5-23.pdf](https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1087075/mod_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20IV-tecniche%20immunochemiche%205-5-23.pdf) .
- [9] «dir.uniupo.it,» [Online]. Available:  
[https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1087075/mod\\_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20IV-tecniche%20immunochemiche%205-5-23.pdf](https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1087075/mod_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20IV-tecniche%20immunochemiche%205-5-23.pdf).
- [10] «dir.uniupo.it,» [Online]. Available:  
[https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1086004/mod\\_folder/content/0/Proteine%20fase%20acuta%20e%20tracciati%20elettroforetici.pptx?forcedownload=1](https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1086004/mod_folder/content/0/Proteine%20fase%20acuta%20e%20tracciati%20elettroforetici.pptx?forcedownload=1).
- [11] A. E, «Unife,» [Online]. Available:  
[https://docente.unife.it/elena.adinolfi/ricerca/lezione%203%20gli%20anticorpi.pdf/at\\_download/file](https://docente.unife.it/elena.adinolfi/ricerca/lezione%203%20gli%20anticorpi.pdf/at_download/file).
- [12] «The enigmatic function of IgD: some answers at last,» *Eur J Immunol*, vol. 48, n. 7, pp. 1101-1113, 2018.
- [13] [Online]. Available:  
<https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/12365>

73/mod\_resource/content/1/Lezione%2019\_IS  
TAMINA.pdf.

- [14] [Online]. Available:  
[https://www.treccani.it/enciclopedia/immunoglobulina\\_%28Dizionario-di-Medicina%29/](https://www.treccani.it/enciclopedia/immunoglobulina_%28Dizionario-di-Medicina%29/) .
- [15] [Online]. Available:  
<https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/c/crioglobuline> .
- [16] I. M. W. Group, «Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders; a report of the International Myeloma Working Group,» *Br J Haematol*, n. 121, pp. 749-757, 2003.
- [17] [Online]. Available:  
[https://dynamics.accmed.org/wp-content/uploads/2020/03/1.1\\_patologia\\_ematologia\\_PDF.pdf](https://dynamics.accmed.org/wp-content/uploads/2020/03/1.1_patologia_ematologia_PDF.pdf).
- [18] R. S. Wadhera RK, «Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: a systematic review,» *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 85, n. 10, pp. 933-942, 2010.
- [19] L. O. McMaster ML, «Prevalence, clinical aspects, and natural history of IgM MGUS,» *Cytometry B Clin Cytom*, vol. 78, pp. 91-97, 2010.

- [20] B. J, «Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance,» *Clinical Practice*, vol. 355, n. 26, pp. 2765-2770, 2006.
- [21] G. A., «Resesarch Unipd,» 2009. [Online]. Available: <https://hdl.handle.net/11577/3426524>.
- [22] J. M. P. M. e. a. Cicero KI, «Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance in Black South African Men,» *Cancer Epidemiol Biomarkers*, vol. 31, n. 12, pp. 2192-2198, 2022.
- [23] R. S. Kyle Ra, «Monoclonal gammopathy of undetermined significance,» *Br J Haematol*, 2006.
- [24] B. M. G. C. e. a. Aguzzi F, «Occurrence of monoclonal components in general practice: clinical implications,» *Eur J Haematol*, pp. 192-195, 1992.
- [25] S. JP, «Monoclonal gammopathies in the adult population of Finistère, France,» *J Clin Pathol*, pp. 63-68, 1982.
- [26] C. N. Schmidt T, «Diagnosis and Management of Monoclonal Gammopathy and Smoldering Multiple Myeloma,» *J Natl Compr Canc Netw*, vol. 18, n. 12, pp. 1720-1729, 2020.
- [27] O. Humanitas, «Gammopatia monoclonale,» [Online]. Available: <https://www.humanitas->

care.it/news/gammopatia-monoclonale-cose-e-che-effetti-ha-sul-paziente/.

- [28] [Online]. Available: <http://www.ematologia-pavia.it/it/patologie/mieloma-multiplo/>.
- [29] S. M. J. S. P. e. a. Moreau P, «ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up,» *Ann Oncol*, vol. 28, pp. 52-61, 2017.
- [30] R. S. Kyle RA, «Monoclonal gammopathies of undetermined significance,» *Best Pract Res Clin Haematol*, vol. 18, n. 4, pp. 689-707, 2005.
- [31] [Online]. Available: [https://www.epicentro.iss.it/tumori/pdf/2020\\_Numeri\\_Cancro-pazienti-web.pdf](https://www.epicentro.iss.it/tumori/pdf/2020_Numeri_Cancro-pazienti-web.pdf) .
- [32] A. W. Group, «I tumori in Italia,» *Epidemiol Prev*, vol. 35, n. 5-6, pp. 1-200, 2011.
- [33] [Online]. Available: <http://www.ematologia-pavia.it/it/patologie/mieloma-multiplo/#:~:text=COSSA%20SONO,del%20sistema%20immunitario%20dette%20plasmacellule>.
- [34] C. E. Ambrosiana, in *Metodologie Biochimiche*, Casa Ed. Ambrosiana, 2012.
- [35] [Online]. Available: <https://iwmf.com/wp-content/uploads/2020/09/MedicalTests-Italian.pdf> .

- [36] [Online]. Available:  
<https://www.ail.it/informati-sulla-malattia/patologie-ematologiche/ail-mileoma/ail-macroglobulinemia> .
- [37] G. J. V. M. e. a. Bad'urovà K, «Waldenstrom macroglobulinemia,» *Klin Onkol*, vol. 34, n. 6, pp. 428-433, 2021.
- [38] M. srl, *Referto fornito dal laboratorio analisi*, 2024.
- [39] [Online]. Available:  
[https://www.treccani.it/enciclopedia/cirrosi\\_%28Universo-del-Corpo%29/](https://www.treccani.it/enciclopedia/cirrosi_%28Universo-del-Corpo%29/).
- [40] V. JF, «Management of hypogammaglobulinemia,» *Rev Med Interne*, vol. 44, n. 3, pp. 133-138, 2023.
- [41] «Immagine fornita dal laboratorio Medical».
- [42] Z. F. Rasel M, «Hypergammaglobulinemia (Policlonal Gammopathy),» *Statpearls*, 2023.
- [43] [Online]. Available:  
<https://docs.google.com/presentation/d/1IR92z zBVPHff7dwDf-sd8WeDFhFOjLb8/edit#slide=id.p29>.
- [44] E. Committee, «Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up,» *Ann Oncol*, vol. 1, n. 28, 2017.

- [45] K. P. G. W. e. a. Ramsenthaler C, «Prevalence of symptoms in patients with multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis,» *Eur J Haematol*, vol. 97, n. 5, pp. 416-429, 2016.
- [46] A. A. S. T. e. a. Georgakopoulou R, «Overweighy/Obesity and Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance,» *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, vol. 21, n. 6, pp. 361-367, 2021.
- [47] [Online]. Available: <https://www.myeloma.org/international-myeloma-working-group-imwg-criteria-diagnosis-multiple-myeloma> .
- [48] [Online]. Available: <https://hdl.handle.net/2434/601646>.
- [49] R. A, «Inquadramento diagnostico del Mieloma Multiplo,» *Atti della Accademia Lancisiana*, 2021.
- [50] [Online]. Available: <https://www.ail.it/informati-sulla-malattia/patologie-ematologiche/ail-mileoma/ail-gammopatia-monoclonale>.
- [51] [Online]. Available: <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/mieloma-multiplo> .

- [52] R. S. Kyle RA, «Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma,» *Leukemia*, vol. 23, n. 1, pp. 3-9, 2009.
- [53] S. M. J. S. P. e. a. Moreau P, «Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up,» *Ann Oncol*, vol. 1, n. 28, 2017.
- [54] [Online]. Available: [https://www.treccani.it/enciclopedia/trapianto-di-midollo\\_\(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica\)/](https://www.treccani.it/enciclopedia/trapianto-di-midollo_(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica)/).
- [55] O. A. R. R. e. a. Rosinol L, «Bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone as induction therapy prior to autologous transplant in multiple myeloma,» *Blood*, vol. 134, n. 16, pp. 1337-1345, 2019.
- [56] [Online]. Available: [https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_000813\\_044636\\_FI.pdf&retry=0&sys=m0b113](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_000813_044636_FI.pdf&retry=0&sys=m0b113).
- [57] A.-A. KA, «Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma without Cryopreservation,» *Bone Marrow Res*, 2012.
- [58] G. F. B. m. Cavo M, «Autologous haematopoietic stem-cell transplantation versus

bortezomib-melphalan-prednisone, with or without bortezomib-lenalidomide-dexamethasone consolidation therapy, and lenalidomide maintenance for newly diagnosed multiple myeloma,» *Lancet Haematol*, vol. 7, n. 6, pp. 456-468, 2020.

[59] G. D. K. M. Cowan Aj, «Diagnosis and Management of Multiple Myeloma,» *JAMA*, vol. 327, n. 5, pp. 464-477, 2022.

[60] [Online]. Available: [https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1085796/mod\\_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20III-tecniche%20elettroforetiche%20280423.pdf](https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1085796/mod_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20III-tecniche%20elettroforetiche%20280423.pdf).

[61] [Online]. Available: <https://www.unife.it/medicina/laboratoriobioedico/insegnamenti/struttura-e-funzioni-delle-molecole-biologiche/modulo-di-laboratorio-di-biochimica/materiale-didattico/05-elettroforesi>.

[62] C. E. Ambrosiana, *Metodologie Biochimiche*, Casa Ed. Ambrosiana, Prima Ed , 2012.

[63] [Online]. Available: [https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1085796/mod\\_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20III-tecniche%20elettroforetiche%20280423.pdf](https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1085796/mod_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20III-tecniche%20elettroforetiche%20280423.pdf).

- [64] [Online]. Available:  
[https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1085796/mod\\_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20III-tecniche%20elettroforetiche%20280423.pdf](https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1085796/mod_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20III-tecniche%20elettroforetiche%20280423.pdf).
- [65] [Online]. Available:  
[https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1085796/mod\\_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20III-tecniche%20elettroforetiche%20280423.pdf](https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1085796/mod_resource/content/1/Tecniche%20Biochimiche%20III-tecniche%20elettroforetiche%20280423.pdf).
- [66] J. K. H. O. e. a. Stolz A, «Recent advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Instrumentation, methodology and applications,» *Electrophoresis*, vol. 40, n. 1, pp. 79-112, 2019.
- [67] [Online]. Available:  
<https://didattica.uniroma2.it/files/scarica/insegnamento/180312-Applicazioni-Di-Biochimica-Clinica-Ed-Industriale/59814-Lezione-10>.
- [68] [Online]. Available:  
<https://docs.google.com/presentation/d/1IR92zZBVPff7dwDf-sd8WeDFhFOjLb8/edit#slide=id.p4>.
- [69] [Online]. Available:  
<https://www.humanitas.it/visite-ed-esami/albumina/> .

- [70] V. A. B. M. Gatta A, «Hypoalbuminemia,» *Intern Emerg Med*, vol. 7, pp. 193-199, 2012.
- [71] D. E. G.-H. C. e. a. Lefrère B, «Bisalbuminemia: A case report,» *Rev Med Interne*, vol. 39, n. 12, pp. 950-954, 2018.
- [72] [Online]. Available:  
<https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/a/analisi-cliniche/protidogramma-o-elettroforesi-proteica#risultati>.
- [73] C. T, «dir.uniupo.it,» 2023. [Online]. Available:  
<https://www.dir.uniupo.it/course/view.php?id=16116>.
- [74] L. O. Naryzny SN, «Haptoglobin as a Biomarker,» *Biochem Mosc Supp B Biomed Chem*, vol. 15, n. 3, pp. 184-198, 2021.
- [75] A. R. B. S. e. a. Levy AP, «Haptoglobin: basic and clinical aspects,» *Antioxid Redox Signal*, vol. 12, n. 2, pp. 293-304, 2010.
- [76] M. A. V. M. Shih AW, «Haptoglobin testing in hemolysis: measurement and interpretation,» *Am J Hematol*, vol. 89, n. 4, pp. 443-447, 2014.
- [77] D. S. G. C. C. e. a. di Masi A, «From hemoglobin scavenging to human health,» *Mol Aspects Med*, 2020.

- [78] [Online]. Available: <https://www.treccani.it/enciclopedia/aptoglobina/>.
- [79] [Online]. Available: <https://www.ospedalebambinogesu.it/elettroforesi-proteica-97145/>.
- [80] «Immagine fornita dal tutor aziendale».
- [81] D. G. F. A. e. a. Bìrò L, «Cytokine regulation of the acute-phase protein levels in multiple myeloma,» *Eur J Clin Invest*, vol. 28, n. 8, pp. 679-686, 1998.
- [82] O. Y. N. K. e. a. Kanzaki G, «Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease and Related Diseases,» *J Nippon Med*, vol. 86, n. 1, pp. 2-9, 2019.
- [83] A. C, *Nozioni fornite dal direttore sanitario del laboratorio Medical, 2023-2024.*
- [84] [Online]. Available: [https://sibioc.it/wp-content/uploads/2021/05/488\\_CALDINI.pdf](https://sibioc.it/wp-content/uploads/2021/05/488_CALDINI.pdf).
- [85] Y. T, «Current status regarding detection of monoclonal component in Japan,» *Rinsho Byori*, vol. 58, n. 4, pp. 397-400, 2010.
- [86] C. G. Arfini C, *Indicazioni iter diagnostico fornite dal direttore sanitario e dal responsabile qualità del laboratorio, 2023-2024.*

- [87] L. B. C. N. e. a. Ganeval D, «Proteinuria in Multiple Myeloma and Related Diseases,» *Am J Nephrol*, vol. 10, pp. 58-62, 1990.
- [88] Q. A. L. E. e. a. Oudart JB, «Urinary investigations in the diagnosis and monitoring of monoclonal gammopathies in daily practice,» *Ann Biol Clin*, vol. 72, n. 2, pp. 147-152, 2014.
- [89] M. G, «Perchè è importante identificare e segnalare le piccole componenti monoclonali,» *Biochimica Clinica*, pp. 25-28, 2012.
- [90] [Online]. Available: [https://sibioc.it/wp-content/uploads/2021/05/672\\_199-207\\_dolci.pdf](https://sibioc.it/wp-content/uploads/2021/05/672_199-207_dolci.pdf).
- [91] M. srl, «Immagine immunofissazione fornita dal laboratorio,» 2024.
- [92] J. I. Ramakrishnan N, «Bence-Jones Protein,» *StatPearls*, 2024.
- [93] [Online]. Available: [https://www.sipmel.it/download/116212-2017\\_GdS-P\\_LG-MGUS\\_protetto.pdf](https://www.sipmel.it/download/116212-2017_GdS-P_LG-MGUS_protetto.pdf).
- [94] D. J. E. F. e. a. González-Calle V, «Bence Jones proteinuria in smoldering multiple myeloma as a predictor marker of progression to symptomatic multiple myeloma,» *Leukemia*, vol. 30, n. 10, pp. 2026-2031, 2016.

- [95] «Badgjar SB, Rane AM, Palav AA,» *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2022.
- [96] M. srl, *Procedura Bence Jones utilizzata e fornita dal laboratorio analisi*, 2023.
- [97] *Immagine fornita dal tutor aziendale*, 2024.
- [98] C. G, *Metodiche di laboratorio spiegate dal tutor aziendale*.
- [99] M. srl, *Immagine test Bence Jones Outcherlony fornita dal laboratorio*.
- [100] [Online]. Available: <https://www.sebia.com/it-it/tests/proteine-sieriche-in-elettroforesi-capillare/>.
- [101] [Online]. Available: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.omnia-health.com%2Fproduct%2Fsebia-minicap-automated-capillary-electrophoresis-system&psig=AOvVaw24vAN8tox0rD-oPGJWHv8M&ust=1718222825103000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBAQjRxqFwoTCKCL2fys1>.
- [102] [Online]. Available: <https://www.beckmancoulter.com/products/chemistry/au680> .

- [103] [Online]. Available:  
<https://www.beckmancoulter.com/products/chemistry/au680> .
- [104] C. G. G. S. Arfini C, *Discussione e analisi delle possibili cause alla base del minor numero di test di 2° livello eseguiti in seguito ad indagine elettroforetica, 2023-2024.*
- [105] M. srl, «Paziente appartenente alla coorte con tracciato elettroforetico non patologico,» 2024.
- [106] M. srl, «Paziente appartenente alla coorte con possibile diagnosi di macroglobulinemia di Waldenstrom».
- [107] A. C, *Possibile diagnosi di macroglobulinemia di Waldenstrom, 2024.*
- [108] M. srl, «Progressione 1 tracciato elettroforetico paziente 1142,» 2023.
- [109] M. srl, «Progressione 2 tracciato elettroforetico paziente 1142,» 2023.
- [110] M. srl, «Progressione 3 tracciato elettroforetico paziente 1142,» 2024.
- [111] H. C. Z. J. Bai Z, «Prevalence and risk factors of monoclonal gammopathy in patients with autoimmune inflammatory rheumatic disease: A systematic review and meta-analysis,» *Mod Rheumatol*, vol. 33, n. 4, pp. 792-802, 2023.

- [112] P. A. T. N. Moreno DF, «Defining an Ultra-Low Risk Group in Asymptomatic IgM Monoclonal Gammopathy,» *Cancers*, vol. 13, n. 9, p. 2055, 2021.
- [113] L.-G. A. R. C. e. a. Blade J, «Malignant transformation and life expectancy in monoclonal gammopathy of undetermined significance,» *Br J Haematol*, vol. 81, n. 3, pp. 391-394, 1992.
- [114] T. A. V. M. Greco A, «Factors predicting transformation of asymptomatic IgM monoclonal gammopathy,» *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, vol. 11, n. 1, pp. 77-79, 2011.
- [115] D. B. R. S. e. a. Kyle RA, «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*, vol. 24, n. 6, pp. 1121-1127, 2010.
- [116] R. S. Kyle RA, «Monoclonal gammopathy of undetermined significance,» *Br J Haematol*, vol. 134, n. 6, pp. 573-589, 2006.
- [117] B. M. G. C. e. a. Aguzzi F, «Occurrence of monoclonal components in general practice: clinical implications,» *Eur J Haematol*, vol. 48, n. 4, pp. 192-195, 1992.

- [118] «dir.uniupo.it,» 2024. [Online]. Available: [https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1258801/mod\\_folder/content/0/Variabilit%C3%A0%20extra%20analitica%20e%20analitica.pptx?forcedownload=1](https://www.dir.uniupo.it/pluginfile.php/1258801/mod_folder/content/0/Variabilit%C3%A0%20extra%20analitica%20e%20analitica.pptx?forcedownload=1).
- [119] C. G. G. S. Arfini C, *Criteri per l'utilizzo dei test di 1° e 2° livello*, 2024.
- [120] M. L. I. J. e. a. Gregersen H, «The impact of M-component type and immunoglobulin concentration on the risk of malignant transformation in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance,» *Gregersen H, Mellekjaer L, Ibsen JS, Dahlerup JF, Thomassen L, Sørensen HT. The impact of M-comHaematologica*, vol. 86, n. 11, pp. 1172-1179, 2001.
- [121] [Online]. Available: [https://sibioc.it/wp-content/uploads/2021/05/672\\_199-207\\_dolci.pdf](https://sibioc.it/wp-content/uploads/2021/05/672_199-207_dolci.pdf).
- [122] [Online]. Available: <https://www.ospedalebambinogesu.it/elettroforresi-proteica-97145/>.
- [123] C. J. S. S. Derman B, «When a Monoclonal Gammopathy Is Not Multiple Myeloma,» *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, n. 42, pp. 1-10, 2022.
- [124] B. F. D. A. e. a. Femand JP, «Monoclonal gammopathy of clinical significance: a novel

- concept with therapeutic implications,» *Blood*, vol. 132, n. 14, pp. 1478-1485, 2018.
- [125] S. G, «Serum and Urine Protein Electrophoresis and Serum-Free Light Chain Assays in the Diagnosis and Monitoring of Monoclonal Gammopathies,» *J Appl Lab Med*, vol. 5, n. 6, pp. 1358-1371, 2020.
- [126] «Epidemiology of monoclonal gammopathy in a general Hospital and a University Internal Medicine Department,» *La Revue de Médecine Interne*, vol. 28, pp. 670-676, 2007.
- [127] S. J. e. al, «Monoclonal gammopathies in the adult population of Finistère, France,» *J Clin Pathol*, pp. 63-68, 1982.
- [128] A. W. Group, «I tumori in Italia,» *Epidemiol Prev*, vol. 35, n. 5-6, pp. 1-200, 2011.
- [129] [Online]. Available: <https://www.uniba.it/it/docenti/semeraro-fabrizio/attivita-didattica/patologia-generale-farmacia-2023-2024/4-immunologia.pdf/@@download/file/4.%20immunologia.pdf>.
- [130] G. M. T. T. e. a. Dispenzieri A, «Retrospective cohort study of 148 patients with polyclonal gammopathy,» *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 76, n. 5, pp. 476-487, 2001.

- [131] I. group, 2024. [Online]. Available: <https://ibsgroupe.com/en/product/minicap-flex-piercing-new/>.
- [132] G. S, *Percentuale di pazienti appartenenti alla coorte suddivisi in base al sesso*, 2024.
- [133] G. S. Cabrini G, *Pazienti patologici nelle varie fasce d'età*, 2024.
- [134] G. S. Cabrini G, *Incidenza delle possibili gammopatie monoclonali in base al genere*, 2024.
- [135] G. S, *Incidenza test 1° livello*, 2024.
- [136] G. S. Cabrini G, *Incidenza delle possibili gammopatie monoclonali in base all'età*, 2024.
- [137] G. S, *Pazienti che hanno proseguito l'iter diagnostico*, 2024.
- [138] G. S., *Incidenza*, 2024.
- [139] M. M. N. N. e. a. Simundic AM, «Bisalbuminemia in a male Croatian patient with sarcoidosis.,» *Biochem Med (Zagreb)*, vol. 19, pp. 95-100, 2009.