

Qual è l'importanza diagnostica dell'elettroforesi delle sieroproteine?

Dr. Giovanni Togni
Labmed, 13.3.2025

1

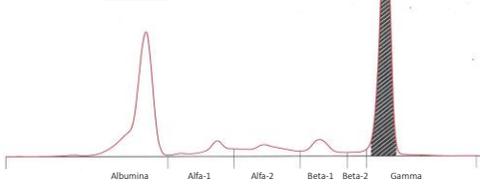
Caso: M. T. (M.; 18.9.1941)

Analisi	Risultato	Unità	Valori rif.
Ematologia			
Emoglobina	-	101	g/L 125 - 172
Eritrociti	-	3.23	TA 4.00 - 5.65
Ematocrito	-	0.299	L/L 0.370 - 0.490
MCV	-	91.2	fL 80 - 101
MCH	-	30.8	pg 27.0 - 34.0
MCHC	-	338	g/L 315 - 360
Thrombociti	---	81	GA 160 - 370
Leucociti	-	3.9	GA 3.5 - 10.5
Analisi			
	Risultato	Unità	Valori rif.
Chimica clinica			
Creatinina	+	115	µmol/L 62 - 105
eGFR (CKD-EPI)	-	51	ml/min/1.73 m² 80
Proteine totali	+	193	g/L 64 - 83

2

Caso: M. T. (M; 18.9.1941)

Frazioni	Concentrazione (g/L)	Intervallo di riferimento
Albumina	37.3	37.3 - 47.6
Alfa-1	5.9	2.1 - 3.5
Alfa-2	7.3	3.4 - 6.5
Beta-1	5.9	3.3 - 5.2
Beta-2	1.1	2.2 - 4.8
Gamma	46.3	2.8 - 18.5
Proteine totali	103.8	64.0 - 83.0
Componente monoclonale	44.1	



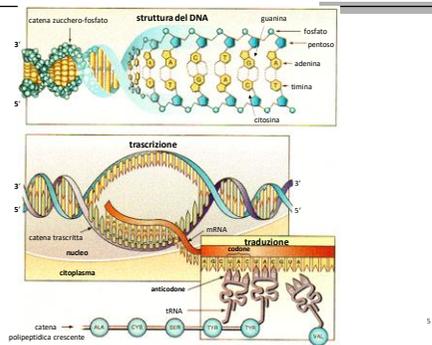
3

Biosintesi delle proteine plasmatiche

- più di 40'000 proteine nel plasma
 - 1'000 sono state identificate
 - semplici
 - glicoproteine
 - lipoproteine
- proteine totali: 60 - 80 g/L
- turnover giornaliero di 25 g
- prodotte:
 - fegato (80%)
 - plasmacellule (20%)

4

Biosintesi delle proteine plasmatiche



5

Proteine totali: ipoproteinemica

- diminuzioni delle PT sono dovute a:
 1. pseudoipoproteinemica
 2. diminuzione delle proteine intravasali (albumina >> globuline)
- 1. pseudoipoproteinemica:
 - sanguinamenti massicci
 - liquido rientra nei vasi per compensare
 - terapia con infusione
 - volume intravasale aumenta
 - polidipsia o
 - gravidanza
 - volume intravasale aumenta

6

Proteine totali: ipoproteinemica

2. diminuzione delle proteine intravasali:
 - insufficiente apporto
 - malnutrizione: marasma o Kwashiorkor
 - disturbi alla digestione delle proteine
 - disturbi all'assorbimento di aa e/o proteine
 - malassorbimento da infiammazione intestinale
 - m. Crohn
 - colite ulcerosa
 - m. celiaco
 - disturbi della sintesi
 - acquisiti: epatopatie
 - ereditari: analbuminemia, ipogammaglobulinemia
 - perdita di proteine
 - essudazioni
 - ascite, ripetute punzioni, enteropatie
 - proteinuria

7

7

Proteine totali: iperproteinemica

- aumenti delle PT sono dovute a:
 1. pseudoiperproteinemica
 1. aumento delle globuline
 1. cause possono essere:
 - sete
 - diarrea
 - vomito
 - fase poliurica dell'insufficienza renale e
 - diabete insipido
 2. aumento più raro della diminuzione (di solito Ig):
 - gammopatie monoclonali (plasmocitoma, m. Waldenström)
 - malattie croniche-attive di tipo infiammatorio
 - stadio compensato della cirrosi epatica
- aumenti >90 g/L, causano problemi di viscosità

8

8

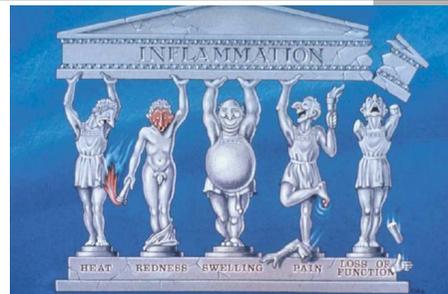
Proteine della fase acuta (PFA)

- prodotte in risposta a:
 - cause infiammatorie
 - chimiche o fisiche
 - necrosi ischemiche
 - neoplasie
 - reazioni immunologiche o
 - allergiche
- scopo:
 - circoscrivere il danno
 - preparare l'organismo prima della reazione specifica

9

9

Segni cardinali d'infiammazione acuta



calore rossore gonfiore dolore perdita di funzione

10

10

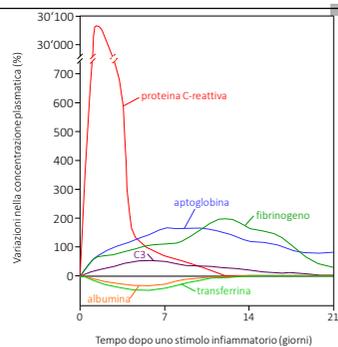
Proteine della fase acuta (PFA)

- nel fegato l'IL-6 stimola la produzione di PFA
- proteine che diminuiscono (negative)
 - albumina
 - transferrina
 - prealbumina
- proteine che aumentano (positive)
 - CRP aumenta 10-1000x
 - altre 2-3x
- ampiezza dipende da causa a causa
 - infiammazioni/infezioni batteriche maggiori di quelle virali e necrotizzanti (tumori e infarto)
- il ritorno alla normalità avviene entro 2 settimane

11

11

Proteine della fase acuta (PFA)



12

12

Prealbumina

- proteina prodotta dal fegato (PFA -)
- ricca in triptofano
- concentrazione sierica: 0.1 - 0.4 g/L
- funzioni
 1. legame e trasporto di tirossina
 2. legame e trasporto di rbp alla quale è attaccata vitamina A (30-50%)
- $t_{1/2}$ =2 giorni
- diminuzione se danni acuti al fegato o carente assunzione

13

13

Albumina

- proteina più abbondante (37.3 – 47.6 g/L; 50 - 60%)
- singola catena pp (69'000) contenente 18 SS
- non è una glicoproteina
- prodotta nel fegato
- è una PFA (negativa)
- funzioni:
 - 1) trasporto: acidi grassi liberi (NEFA), bilirubina, ormoni tiroidei e aldosterone, ca. 1/3 del calcio plasmatico, oligoelementi (Zn, Mg, Cu), farmaci (aspirina, penicillina, ...)
 - 2) osmosi: 80% dell'azione osmotica
 - concentrazione <25 g/L -> edema
 - 3) riserva di aminoacidi (in caso di mancanza di altri nutrienti)
 - 4) equilibrio acido-base

14

14

α_1 -Antitripsina

- prodotta dal fegato
- è una PFA (positiva)
- concentrazione sierica: 1.9 - 3.5 g/L
- migra in α_1 (4/5 della frazione)
- $t_{1/2}$ =3.9 giorni
- funzioni fisiologiche:
 - inibitore di proteasi (tripsina, elastasi, plasmina, trombina, ...)
- polimorfismo genetico:
 - fenotipo MM 90% della popolazione -> concentrazione normale
 - ca. 10% fenotipo PiZZ, PiMZ e PiSZ (10-20% della conc. normale)
- diminuzione (epatite neonatale, enfisema polmonare grave)
- aumenti dovuti a contraccettivi orali e gravidanza

15

15

α_1 -Glicoproteina acida

- prodotta dal fegato
- è una PFA (positiva)
- concentrazione sierica: 0.6 - 1.4 g/L
- migra in α_1
- $t_{1/2}$ = 5 giorni
- ricca in carboidrati che la rendono stabile e solubile in acidi
- nella fase acuta aumenta nelle prime 24-48 ore anche di 3x

16

16

Aptoglobina (Hp)

- prodotta dal fegato
- Hp è una PFA (positiva)
- concentrazione sierica: 1 - 3 g/L (1/4 della frazione α_2)
- migra in α_2
- composta da due catene leggere α (Mm = 9'000) e due catene pesanti β (16'000)
- polimorfismo della catena α da origine a 3 fenotipi (Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2) osservabili in elettroforesi
- lega Hb nelle emolisi intravasali
- il complesso Hp - Hb viene captata mediante recettori epatici
- $t_{1/2}$ =3-4 giorni non legata, $t_{1/2}$ =8 minuti legata ad Hb

17

17

α_2 -Macroglobulina

- prodotta dal fegato, macrofagi e fibroblasti
- non è una PFA
- Mm 720'000 Da
- concentrazione sierica: 1.1 - 3.0 g/L
- migra in α_2 (1/3 della frazione)
- $t_{1/2}$ = 5 minuti (degradazione nel RES e fibroblasti)
- antiproteinasi ad ampio spettro
- aumenti:
 - sindrome nefrosica
- diminuzioni:
 - consumo (post-operatorio, sepsi, iperfibrinolisi)
 - sintesi insufficiente

18

18

Transferrina

- prodotta dal fegato e meno dal midollo osseo
- è una PFA (negativa)
- concentrazione sierica: 2.3 - 4.4 g/L
- migra in $\beta 1$
- $t_{1/2}=7$ giorni
- funzioni fisiologiche:
 - ogni molecola lega 2 atomi di Fe^{3+} (1/3 della Tf è saturo)
 - lega $Fe^{3+} >> Cr^{3+} > Cu^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+}$
- diminuzione nelle insufficienze epatiche e malnutrizione, perdita renale, infiammazioni, traumi e ustioni, sovraccarico di Fe (emocromatosi, emosiderosi)
- aumenta nelle carenze di ferro

19

23

Emopessina

- prodotta dal fegato
- Hp non è una PFA
- concentrazione sierica: 0.5 - 1.15 g/L
- migra in $\beta 1$
- lega Hb libera
- complesso Hpx - Hb viene captata mediante recettori epatici
- $t_{1/2}=7$ giorni non legata, $t_{1/2}=7$ ore legata ad Hb
- diminuzioni si osservano nelle emolisi intravasali (gravi) e nelle insufficienze epatiche
- aumenti si osservano nel DM e emocromatosi

20

20

Complemento C3

- prodotta dal fegato, adipociti e macrofagi
- è una PFA (positiva)
- concentrazione sierica: 0.9 - 1.8 g/L
- migra in $\beta 2$
- partecipa alla cascata del complemento
- diminuzioni nelle infezioni, LES attivo, glomerulonefrite membranoproliferativa, sindrome uremica emorragica (SEU)
- elevato nelle reazioni di fase acuta

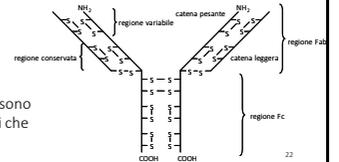
21

21

Immunoglobuline

Classe	Mm (Da)	Concentrazione sierica (g/L)	% della frazione gammaglobulinica
IgG	150'000	7.0 - 16.0	≈ 80
IgM	900'000	0.4 - 2.3	6
IgA	160'000	0.7 - 4.0	13
IgD	185'000	0.0 - 0.4	1
IgE	200'000	<0.1	0.002

- quattro catene:
 - 2 leggere (215 aa)
 - 2 pesanti (450 aa)
- ponti disolfuro
- N-terminali di ogni catena sono formate da regioni variabili che legano Ag



22

22

Elettroforesi

- separazione in base alla diversa velocità di migrazione delle particelle caricate
- macromolecole (DNA, RNA e proteine)
- velocità di migrazione delle proteine dipende da:
 1. carica elettrica netta della proteina,
 2. grandezza e forma della proteina,
 3. grandezza del campo elettrico,
 4. proprietà del mezzo di migrazione e
 5. temperatura della migrazione

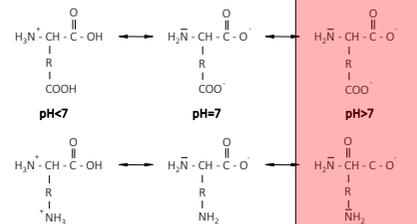
23

23

Elettroforesi delle proteina

- a dipendenza del pH possono assumere cariche positive o negative

- acidi (acido glutammico e aspartico)
- basici (arginina, lisina e istidina)



24

24

Separazione delle proteine



25

Strumenti elettroforetici

Elettroforesi «classica»
(gel di agarosio)



■ Hydrasys® (Sebia)

Elettroforesi capillare

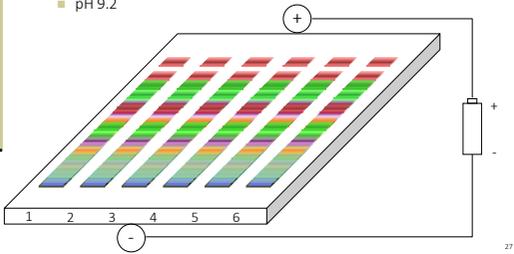


■ MINICAP Flex Piercing® (Sebia)

26

Elettroforesi su gel di agarosio (AGE)

- separazione
- corrente elettrica a 20 W
- pH 9.2

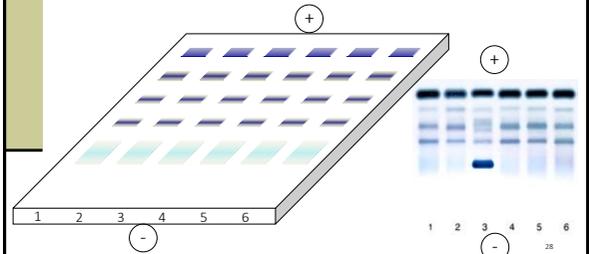


27

27

Elettroforesi su gel di agarosio (AGE)

- colorazione
- Amidoblack

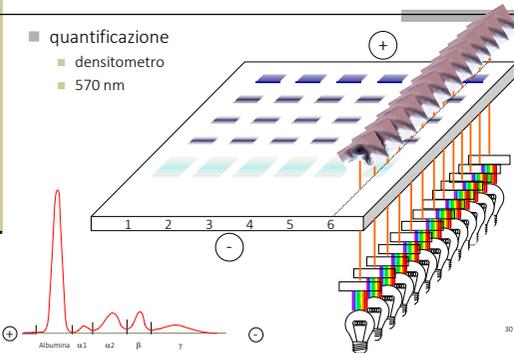


28

28

Elettroforesi su gel di agarosio (AGE)

- quantificazione
- densitometro
- 570 nm

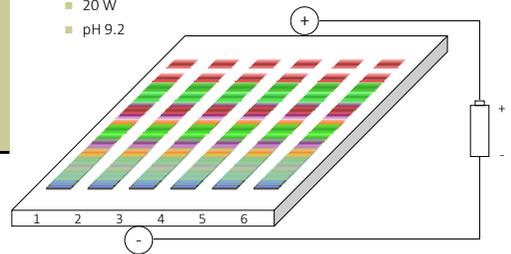


30

30

Immunofissazione (IFE)

- separazione
- 100-150 V
- 20 W
- pH 9.2



31

31

Immunofissazione (IFE)

- colorazione
 - antisieri corrispondenti
 - Amidoblack

32

Elettroforesi capillare

- vantaggi
 - analisi di una grande serie di campioni (60/h contro 30/h)
 - impiego minimo di personale (automazione)
- campioni caricati su rack (fino a 13) o carosello (28)
- si possono caricare provette primarie o secondarie

34

Elettroforesi capillare

- siero prediluito 1:5 con tampone di migrazione
- campo elettrico di 7 kV per 4 minuti in 2/8 capillari di silice fusa
 - lunghezza totale: 17.5 cm
 - diametro interno 25 µm
- tampone pH 9.9 a 35.5°C
- lettura delle proteine a 200 nm

35

Elettroforesi capillare ed immunotyping

36

Le gammopatie

- Gammopatia di significato incerto (MGUS)
 - condizione asintomatica
 - 3.2% della popolazione caucasica > 50 anni
 - proteina monoclonale (M proteina) < 30 g/L nel siero
 - e < 10% di plasmacellule monoclonali nel midollo
 - senza evidenza di danni d'organi ("CRAB": ipercalcemia, nefropatia, anemia o danni ossei), linfoma, macroglobulinemia di Waldenström o amiloidosi a catene leggere (AL)
- Mieloma multiplo smoldering (SMM)
 - asintomatico
 - M proteina ≥ 30 g/L e/o
 - ≥ 10% di plasmacellule monoclonali nel midollo osseo
 - senza caratteristiche CRAB

38

Criteri diagnostici

MGUS	Mieloma Multiplo Smoldering (SMM)	Mieloma multiplo (MM)
M-proteina < 30 g/L	M-proteina ≥ 30 g/L	Danno d'organo terminale (CRAB) compresi una o più lesioni osteolitiche alla radiografia, ma più di una lesione è richiesta se < 10% di plasmacellule nel midollo. Alla RM deve essere presente più di una lesione > 5 mm di dimensione.
E	E/O	E/O
Plasmacellule clonali nel midollo osseo < 10%	Proteina monoclonale urinaria ≥ 500 mg/24 h	Plasmacellule clonali nel midollo osseo > 60%
E/O	E/O	E/O
Proteina monoclonale urinaria < 500 mg/24 h	Plasmacellule nel midollo osseo ≥ 10%	Una delle catene leggere libere coinvolte (kappa o lambda) > 100 mg/L con un rapporto fra la catena leggera libera coinvolta/non coinvolta anche > 100 mg/L
Pazienti con SMM potrebbero necessitare di esami ad immagine supplementari come PET-CT, CT di tutto il corpo a basse dosi, RM di tutto il corpo o spina/pelvi		

39

Predittori di progressione

Fattori di rischio di progressione

M-proteina > 15 g/L
 Isotipo non-IgG (IgA o IgM)
 Rapporto FLC < 0.26 o > 1.65

40

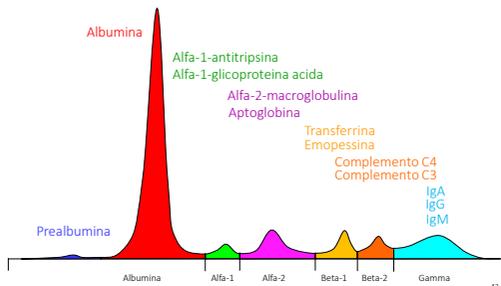
Rischio di progressione degli MGUS

Rischi associati	Classificazione	Monitoraggio e valutazione
Nessun fattore di rischio	Basso rischio MGUS (rischio assoluto di progressione del 5% a 20 anni)	Ripetere elettroforesi dopo 6 mesi e poi ogni 2-3 anni se stabile. Midollo o sorveglianza dello scheletro non necessari.
1 fattore di rischio	Rischio basso-intermedio MGUS (rischio assoluto di progressione del 21% a 20 anni)	Biopsia del midollo osseo con FISH
2 fattori di rischio	Rischio alto-intermedio MGUS (rischio assoluto di progressione del 37% a 20 anni)	Considerare TAC addominale se presente IgM monoclonale per escludere macroglobulinemia di Waldenström
3 fattori di rischio	Rischio elevato MGUS (rischio assoluto di progressione del 58% a 20 anni)	LDH, β2 microglobulina, CRP

Se tutti i criteri sopra sono normali eseguire emogramma, elettroforesi e creatinina dopo 6 mesi e poi annualmente a vita

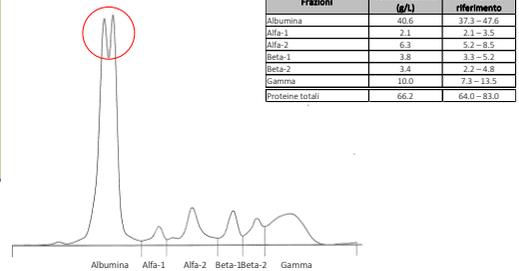
41

Frazioni e proteine



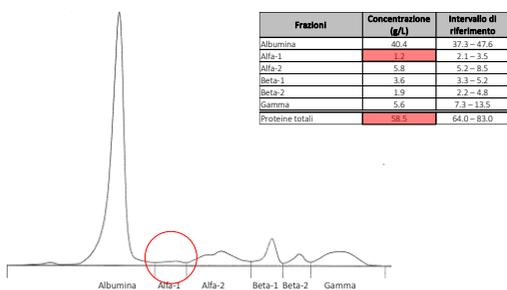
43

Bisalbuminemia



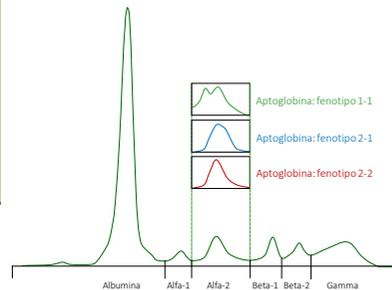
44

Ridotta α₁-antitripsina



45

Aptoglobina



46

40

41

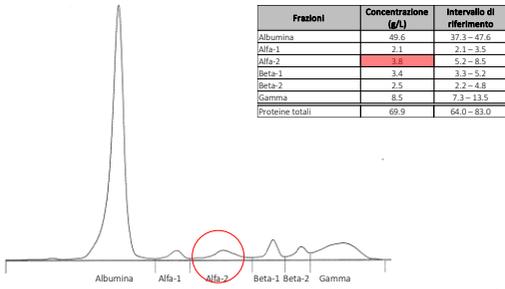
43

44

45

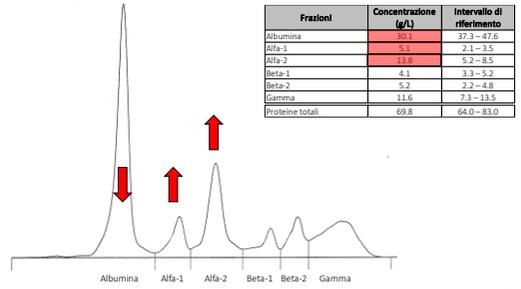
46

Riduzione aptoglobina/ α_2 -macroglobulina



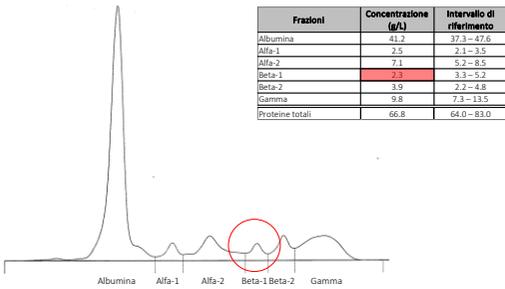
47

Stato infiammatorio acuto



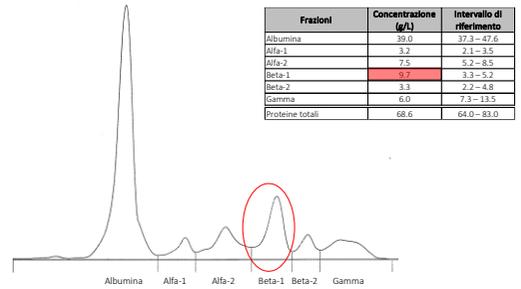
48

Riduzione transferrina/emopessina



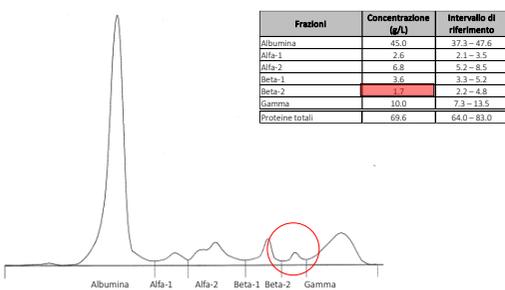
49

Aumento transferrina



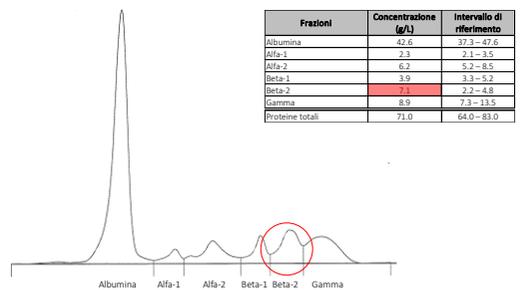
50

Riduzione di C3



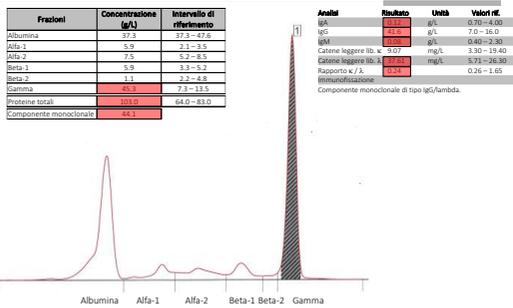
51

Plasma EDTA: fibrinogeno



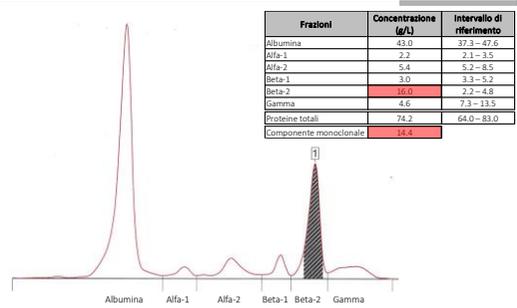
52

Caso: M. T. (M; 18.9.1941)



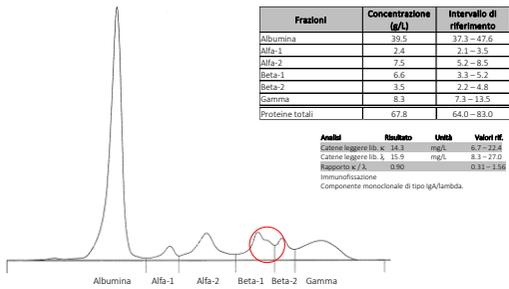
54

Caso: D. M. (F; 24.6.1941)



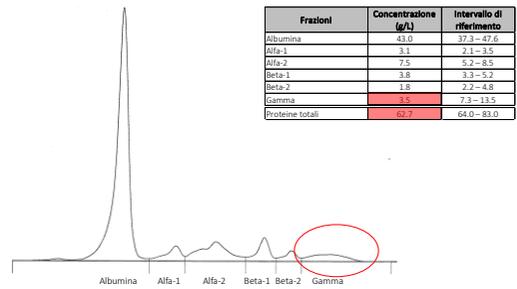
56

Caso: F. A. (M; 17.4.1946)



57

Ipogammaglobulinemia



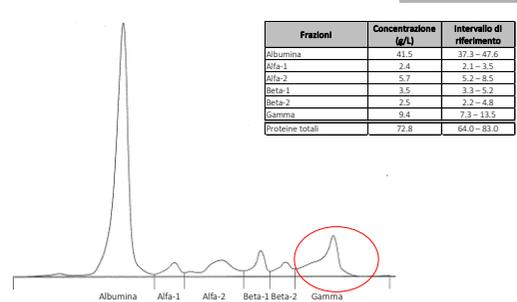
58

Conclusioni

- in sospetto di CM (+ catene leggere libere)
- monitoraggio CM
- per malattie associate a:
 - mieloma multiplo
 - macroglobulinemia di Waldenström
 - plasmocitoma solitario
 - mieloma multiplo smoldering
 - MGUS
 - leucemia plasmacellulare
 - malattia delle catene pesanti
 - amiloidosi
- diagnostica/monitoraggio stati infiammatori
- sospetta carenza di α₁-antitripsina

59

Caso conclusivo



60

Grazie per l'attenzione



61