

# Linee guida nella ricerca delle crioglobuline

M. Ruggeri<sup>a</sup>, I. Brusca<sup>b</sup>, F. Bottan<sup>a</sup>, B. Milanese<sup>c</sup>, L. Cinquanta<sup>d</sup>, M. Tani<sup>c</sup>, S. Mangraviti<sup>e</sup>,  
C. Ottomano<sup>f</sup>, M. Gallina<sup>g</sup>

Gruppo di Studio-Proteine SIMeL

<sup>a</sup>Azienda Ospedaliera "S. Giovanni-Addolorata", Roma

<sup>b</sup>Ospedale "Buccheri-La Ferla", Palermo

<sup>c</sup>Azienda Ospedaliera, Desenzano del Garda (BS)

<sup>d</sup>Azienda Ospedaliera "San Giovanni di Dio e Ruggi D' Aragona", Salerno

<sup>e</sup>IRCCS "G. Gaslini", Genova

<sup>f</sup>Ospedali Riuniti, Bergamo

<sup>g</sup>Ex Azienda Ospedaliera della Valtellina e della Valchiavenna, Presidio di Sondalo (SO)

## Riassunto

Le crioglobuline sono un gruppo di proteine con la comune proprietà di formare un precipitato o un gel a freddo e ritornare in soluzione a 37 °C

Sono presenti in una vasta gamma di manifestazioni morbose e sono rappresentate da un gruppo eterogeneo di immunoglobuline (Ig) che, dopo purificazione e all'analisi immunochimica possono presentarsi nella forma singola o mista.

Secondo la classificazione di Brouet si distinguono:

- crioglobulinemia di tipo I in cui il crioprecipitato è costituito da una singola Ig monoclonale completa (IgG, IgA, IgM) o, più raramente, da una singola catena leggera.

Si riscontra con maggiore frequenza nei pazienti affetti da malattie linfoproliferative, mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldenstrom

- crioglobulinemia di tipo II in cui il crioprecipitato è costituito da IgM monoclonale e IgG policlonale o oligoclonale, mista, e si associa a malattie linfoproliferative, malattie autoimmuni e HCV.

- crioglobulinemia di tipo III in cui il crioprecipitato è costituito da IgG, IgA e IgM policlonali, mista e sono riscontrabili in pazienti con malattie autoimmuni e infezioni croniche.

La positività delle crioglobuline è fortemente condizionata dal comportamento metodologico; solo rispettando rigorosamente, nella fase preanalitica, la catena del caldo (prelievo, trasporto e centrifugazione a 37 °C) e nella fase di conservazione e tipizzazione le relative regole, possiamo escluderne o confermarne la presenza.

Il sangue viene raccolto senza anticoagulanti, prelevato con una siringa riscaldata a 37 °C e tenuto a questa temperatura finché coagula. Il siero viene separato con centrifugazione a 37 °C a 800 g per 15 minuti. Viene aliquotato in una provetta ed in un tubo di Wintrobe e tenuti entrambi a 4 °C. Se sono presenti crioglobuline appare dopo un periodo variabile da 24 a 72 ore un precipitato bianco o un gel. Il siero deve essere, comunque, tenuto in osservazione per almeno una settimana per essere certi che un crioprecipitato tardivo non possa passare inosservato (HCV correlato).

La reversibilità del crioprecipitato deve essere verificata riscaldando l'aliquota del siero precipitato (prova del nove). Le crioglobuline sono misurate dal volume occupato dal crioprecipitato nel tubo di Wintrobe, espresso come volume percentuale di tutto il siero dopo centrifugazione a 800 g per 20 min a 4 °C. Le crioglobuline precipitate sono isolate dal siero con centrifugazione refrigerata a 4 °C per 30 min. I precipitati sono risospesi in soluzione fisiologica a 4 °C e lavati per tre volte (finché non si rileva albumina all'immunofissazione).

Sul crioprecipitato disciolto si esegue una immunofissazione usando antisiero totale umano e antisieri specifici per  $\gamma, \alpha, \mu, \kappa, \lambda$ . In questo modo le crioglobuline possono essere classificate nei tre tipi prima descritti. Il referto del laboratorio deve prevedere, in presenza di crioglobulinemia, il dato del criocrito e la tipizzazione delle Ig interessate, siano esse monoclonali o policlonali secondo la classificazione di Brouet.

## Summary

### Guidelines for cryoglobulin research

Cryoglobulins are a group of proteins with the common property of forming precipitates when the serum is kept at 4 °C, and then returning to solution when re-heated at 37 °C. They may be found as different immunoglobulin (Ig) isotypes in many diseases. After being purified and passed through an immunochemical process, cryoglobulins can be classified as single or mixed.

According to the Brouet classification cryoprecipitates are established by:

- cryoglobulinemia type I: a single complete monoclonal Ig (IgG, IgA, IgM) or more rarely by a single light chain. It can be found in patients affected by lymphoproliferative disease, multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia.
- cryoglobulinemia type II: a monoclonal IgM and a polyclonal or oligoclonal IgG, linked to lymphoproliferative diseases, autoimmune illnesses or HCV infection.
- cryoglobulinemia type III: polyclonal IgG, IgA and IgM,

found in patients with autoimmune diseases and chronic infections.

The cryoglobulin result is strictly method dependent. Blood is collected without anticoagulant, using a pre-heated needle at 37 °C and kept at this temperature until blood coagulates. The serum is then separated by centrifugation at 37 °C at 800g for 15 minutes. It is then aliquoted and dispensed into a plain tube and a Wintrobe tube that are kept at 4 °C. Cryoglobulins, if present, will appear after 24-72 hours as white precipitates or gel. They, however must be kept under observation for at least one week so that any late cryoglobulin can be noticed. After centrifugation, the amount of cryoglobulin is measured by the percentage level of cryoprecipitate in the Wintrobe tube.

Cryoglobulins can be then classified by immunofixation using total and specific human anti-sera ( $\gamma, \alpha, \mu, \kappa, \lambda$ ). In the presence of cryoglobulinemia, the laboratory reports should include the cryocrit, the Ig isotype, and the clonality (monoclonal or polyclonal), according to the Brouet classification.

*Key-words:* HCV, mixed cryoglobulinemia, immune complexes, immunoglobulins, rheumatoid factor.

## Premessa

Le crioglobulinemie sono condizioni patologiche, note da molto tempo e su cui esistono numerosi studi in letteratura. Negli ultimi anni la scoperta del legame tra l'infezione cronica da virus dell'epatite C e le crioglobuline ha focalizzato su di esse l'attenzione del mondo scientifico ed in particolare della ricerca di base. A questo rinnovato interesse della ricerca, a 70 anni della loro descrizione, non è però corrisposto altrettanto interesse nella pratica di Medicina di Laboratorio. Cosicché vi è una notevole difformità delle procedure preanalitiche ed analitiche nei centri che si occupano della loro ricerca. Il Gruppo di Studio SIMeL sulle Proteine si propone, con questa rassegna, di fornire uno strumento di revisione sulle principali novità in questo campo non disgiunto da raccomandazioni metodologiche utili nella pratica di laboratorio.

## Introduzione

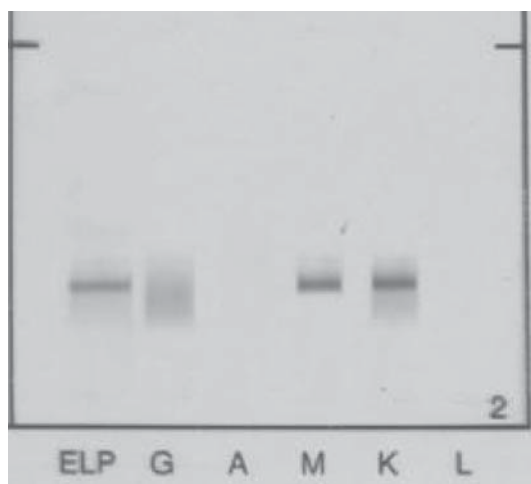
E' stato osservato da diversi secoli ed è alla base di credenze popolari e di fenomeni ritenuti miracolosi, il fatto che il sangue, raccolto in recipienti di vetro, possa cambiare il suo stato fisico da solido a liquido e viceversa. Questo fenomeno, quando è stato possibile studiarlo con metodi scientifici, è risultato derivare da stimoli fisici agenti sul campione: l'agitazione dell'ampolla di vetro, nel caso del sangue di San Gennaro e le variazioni di temperatura, nel caso del sangue di San Lorenzo in Amaseno<sup>1</sup>. Al di fuori di controversie e studi su credenze e fenomeni metafisici il fatto che componenti del sangue possano cambiare di stato, solidificarsi o gelificare, è stato segnalato nel 1933 da Wintrobe e Buell che, in un caso di mieloma multiplo, descrissero il fenomeno della precipitazione a freddo delle immunoglobuline<sup>2</sup>. Nel 1947 Lerner e Watson definirono le caratteristiche della crioprecipitazione coniando il termine "crioglobuline"<sup>3</sup>. Nel 1966, Meltzer e Franklin delinearono le principali associazioni delle crioglobulinemie con la

classica triade caratterizzata da porpora, astenia e artralgie. Le osservazioni successive hanno messo in evidenza che il quadro clinico non si limita semplicemente a questa triade, ma può comprendere anche nefropatie, artropatie, neuropatie periferiche, ipertransaminasemia e linfoproliferazione.

## Definizione e classificazione

Con il termine di crioglobulinemie, s'intende la presenza nel siero di immunoglobuline monoclonali o policlonali, che precipitano ad una temperatura inferiore ai 37 °C. La precipitazione è un fenomeno reversibile, ma le cause e i meccanismi che sottostanno a questo fenomeno sono tuttora poco chiari. In base alle loro caratteristiche immunochimiche, sono stati identificati 3 tipi di crioglobulinemie.

- Crioglobulinemie di tipo I: rappresentano il 10-15% del totale. Sono caratterizzate dalla presenza di singole immunoglobuline monoclonali complete (solitamente IgM, meno frequentemente IgG). Più raramente sono rappresentate da una singola catena leggera, identificabile nelle urine come proteinuria di Bence Jones.
- Crioglobulinemie di tipo II: rappresentano il 50-60% dei casi. Sono caratterizzate da immunoglobuline policlonali (più frequentemente della classe IgG) e da IgM monoclonali, dotate di attività tipo fattore reumatoide (FR) nei confronti delle suddette IgG. Questo significa che le IgM reagiscono con il frammento Fc delle IgG e formano un immunocomplesso che può andare incontro a crioprecipitazione.
- Crioglobulinemie di tipo III: rappresentano il 25-30% dei casi. Sono costituite da IgG e IgM policlonali. Le crioglobulinemie di tipo II e III vengono anche definite crioglobulinemie miste (CM) (Fig. 1 e 2). Sono associate a infezioni batteriche e virali (in particolare infezione da HCV), malattie autoimmuni e disordini linfoproliferativi. In passato veniva definita crioglobulinemia mista es-



**Figura 1.** Crioglobulinemia mista di tipo II.

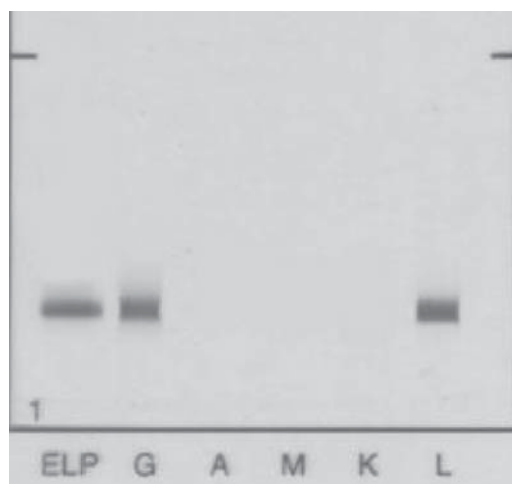
senziale, una forma di crioglobulinemia costituita prevalentemente da crioglobuline di tipo II e dalla presenza di segni e sintomi specifici (artralgie, porpora e marcata astenia) che si è dimostrato essere strettamente associata all'infezione da virus HCV<sup>4</sup>, il quale sembra essere coinvolto non solo nella patogenesi della crioglobulinemia, ma anche in una sua possibile evoluzione verso un linfoma a cellule B. I meccanismi alla base dei fenomeni di crioprecipitazione rimangono oscuri. Potrebbero essere secondari alle caratteristiche intrinseche delle immunoglobuline mono e policlonali, oppure potrebbero dipendere da altri componenti del crioprecipitato, quali antigeni virali o particelle anticorpali. Sono state proposte diverse ipotesi, quali alterazioni a carico dei geni codificanti per le regioni variabili delle catene pesanti o leggere delle immunoglobuline<sup>5</sup>, riduzione di concentrazione dell'acido sialico o di galattosio a livello della porzione Fc delle Ig e altre ancora, ma nessuna è stata in grado di fornire una spiegazione esauriente di questo fenomeno, per altro facilmente dimostrabile in laboratorio

### Raccomandazioni metodologiche

La richiesta di ricerca delle crioglobuline è motivata nelle seguenti condizioni: intolleranza/dolore alle basse temperature delle estremità, sindrome di Raynaud, porpora, vasculiti, orticaria, ulcere, insufficienza renale, malattie linfoproliferative, malattie autoimmuni, infezione da HCV, neuropatie e infezioni croniche. Test di laboratorio che possono suggerire la ricerca di crioglobuline comprendono concentrazioni di C4 inferiori alla norma e aumento dei livelli di FR. La risposta del laboratorio prevede, in presenza di crioglobulinemia, il dato del criocrito e la tipizzazione delle immunoglobuline interessate, siano esse monoclonali o policlonali secondo la classificazione in tipo I, tipo II e tipo III.

Solo rispettando rigorosamente la "catena del caldo" nella fase preanalitica (prelievo e trasporto a 37 °C) e osservando i seguenti suggerimenti è possibile rilevare la positività delle crioglobuline:

- Il sangue deve essere prelevato a digiuno, poiché i lipidi possono interferire.
- Debbono essere utilizzate provette prive di anticoagu-



**Figura 2.** Crioglobulinemia mista di tipo I.

lante e gel separatore.

- Il prelievo deve essere eseguito con materiale preriscaldato e immediatamente posto ad incubare a 37 °C fino a retrazione del coagulo. I sieri dei pazienti con disturbi coagulativi o in terapia anticoagulante necessitano di solito di tempi di incubazione a 37 °C più lunghi.
- Vanno usati recipienti termostatici a 37 °C per il trasporto. E' opportuno che il personale di laboratorio sovrintenda alla corretta esecuzione e al trasporto del prelievo. Quando possibile il paziente va accompagnato al punto prelievo più prossimo al laboratorio.
- Avvenuta la retrazione del coagulo, la centrifugazione deve essere eseguita a 37 °C.
- Il siero va suddiviso in due aliquote: una, in un tubo di vetro graduato per la determinazione del criocrito e una da utilizzare per successivi procedimenti analitici. Entrambe vanno mantenute a 4 °C.
- La crioprecipitazione si determina nella maggior parte dei casi in 48-72 ore. La precipitazione può però avvenire anche più tardivamente, specialmente nelle crioglobulinemie HCV correlate. Nei casi in cui il quadro clinico o bioumorale suggerisca la presenza di crioglobuline e la precipitazione non sia avvenuta in 48-72 ore, è consigliabile protrarre l'incubazione per almeno 7 giorni ed è raccomandabile l'aggiunta di sodio azide (0.1 ml di una soluzione all'1% al siero), per prevenire eventuali crescite batteriche.

La conferma che il precipitato osservato è dovuto a crioglobuline e non ad artefatti (poiché fibrina e fibrinogeno possiedono attività crioprecipitante<sup>6</sup>, la persistenza di fibrina può portare ad errori nella lettura), va effettuata semplicemente portando il campione a 37 °C, nel qual caso si osserva la dissoluzione del crioprecipitato.

- Avvenuta e confermata la precipitazione, la provetta graduata va centrifugata a 1500 g per 15 minuti a 4 °C e il crioprecipitato determinato in percentuale rispetto al volume del siero (criocrito); l'entità del criocrito conferma la diagnosi, ma non correla con la gravità delle manifestazioni cliniche<sup>7,8</sup>. La misura del criocrito può fornire utili indicazioni sulla risposta alla terapia antivirale.
- E' importante ai fini diagnostici e classificativi effettuare la tipizzazione del crioprecipitato: a questo scopo va la-

vato a 4 °C con soluzione fisiologica o PBS, risospeso in soluzione fisiologica o PBS e va effettuata su di esso l'immunofissazione (la conferma dell'efficacia del lavaggio è dimostrata dall'assenza della banda di albumina nel tracciato dell'immunofissazione).

La presenza di IgM-FR monoclonale, o più raramente di IgA, può determinare degli artefatti. In questo caso può essere utilizzato il 2-mercaptoetanololo, da aggiungere al campione sotto cappa alla concentrazione finale dell'1%, per determinare la depolimerizzazione delle IgM e della IgA.

L'utilizzo di metodiche più sensibili per la caratterizzazione del criocrito come l'elettroforesi in gel di poliaccrilamide bidimensionale può evidenziare una microeterogeneità della composizione immunoglobulinica, quale la presenza di IgM oligoclonali o la contemporanea presenza di IgM policlonali e monoclonali. Dal punto di vista classificativo sono ritenute forme intermedie, (probabilmente evolutive), tra il tipo III e il tipo II<sup>9</sup>.

La refertazione delle crioglobuline deve indicare il tempo in cui il siero è stato tenuto ad incubare a freddo e, in caso di positività, la misura del criocrito. Nel caso siano state tipizzate, oltre alla descrizione dei risultati dell'immunofissazione, va indicato il tipo.

La ricerca delle crioglobuline non richiede sofisticate strumentazioni analitiche e non presenta particolari difficoltà dal punto di vista esecutivo, ma è fortemente condizionata dal rigoroso rispetto delle condizioni operative. Le differenze, non solo come resa del criocrito, ma soprattutto in termini di sensibilità, sono notevoli. La tipizzazione delle crioglobuline è importante ai fini classificativi ed eziologici. Nel caso delle crioglobuline miste di tipo II le forme non HCV correlate presentano un rischio 4 volte superiore di sviluppare linfoma non-Hodgkin e uno scarso outcome<sup>10</sup>. Nessun trattamento è richiesto nella crioglobulinemia asintomatica anche in caso di aumento del criocrito. Le forme sintomatiche vanno trattate in base al quadro clinico. Nelle presentazioni lievi-moderate (porpora, artralgie, neuropatia sensoriale periferica), gli steroidi a basso dosaggio sono usualmente sufficienti. Nei pazienti con maggiore coinvolgimento sistemico (nefropatia crioglobulinemica, ulcere cutanee, neuropatia motoria e sensoriale, vasculite) è opportuno utilizzare alti dosaggi di steroidi con o senza ciclofosfamide. La rimozione degli immuni-com-

plessi circolanti tramite plasmaferesi può essere utile, particolarmente nella nefropatia crioglobulinemica attiva. Nelle forme HCV correlate il principale obiettivo del trattamento è l'eradicazione del virus. La risposta alla terapia è evidenziata dalla riduzione dell'HCV- RNA che è seguita dal declino del criocrito.

## Bibliografia

1. Garlaschelli L. Sangue prodigioso. *La Chimica e l'Industria*. 2002; 84:67-70.
2. Wintrobe M, Buell M. Hyperproteinemia associated with multiple myeloma. With report of a case in which an extraordinary hyperproteinemia was associated with thrombosis of the retinal veins and symptoms suggesting Raynaud's disease. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1933; 52:156-65.
3. Lerner AB, Watson CJ. Studies of cryoglobulins; unusual purpura associated with the presence of a high concentration of cryoglobulin (cold precipitable serum globulin). *Am J Med Sci* 1947; 214:410-5.
4. Horcajada JP, Garcia-Bengoechea M, Cilla G, Etxaniz P, Cuadrado E, Arenas JJ. Mixed cryoglobulinaemia in patients with chronic hepatitis C infection: prevalence, significance and relationship with different viral genotypes. *Ann Med* 1999; 31: 352-8.
5. Gerber-Jenson B, Kazin A, Kehoe JM, Scheffel C, Erickson BW, Litman GW. Molecular basis for the temperature-dependent insolubility of cryoglobulins. X. The amino acid sequence of the heavy chain variable region of McE. *J Immunol* 1981; 126:1212-6.
6. Zignego AL, Ferri C, Pileri SA, Caini P, Bianchi FB; for the Italian Association of the Study of Liver Commission on Extrahepatic Manifestations of HCV infection. Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. *Dig Liver Dis* 2007; 39:2-17.
7. Amdo TD, Welker JA. An approach to the diagnosis and treatment of cryofibrinogenemia. *Am J Med* 2004; 116: 332-7.
8. Ferri C, Antonelli A, Mascia MT, Sebastiani S, Fallhai P, Ferrari D, et al. B-cells and mixed cryoglobulinemia. *Autoimmun Rev* 2007; 7:114-20.
9. Ferri C, Zignego AL, Pileri SA. Cryoglobulins. *J Clin Pathol* 2002; 55:4-13.
10. Saadoun D, Sellam J, Ghillani-Dalbin P, Crecel R, Piette JC, Cacoub P. Increased risks of lymphoma and death among patients with non-hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia. *Arch Intern Med* 2006; 166:2101-8.