

# Le Crioglobuline: dalla conoscenza scientifica alla pratica di laboratorio

I. Brusca<sup>a</sup>, M. Ruggeri<sup>b</sup>, F. Bottan<sup>b</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>

per il Gruppo di Studio-Proteine della SIMeL

<sup>a</sup>Ospedale "Buccheri La Ferla Fatebenefratelli", Palermo

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

<sup>c</sup>Azienda Ospedaliera di 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 costituite da una miscela di immunoglobuline e complemento che precipitano a temperatura inferiore ai 37 °C. La presenza di crioglobuline nel siero del paziente è responsabile di una sindrome caratterizzata da fenomeni vasculitici a carico dei vasi di piccolo e medio calibro. L'attuale sistema di classificazione delle crioglobuline è basato principalmente sulla caratterizzazione immunochimica del precipitato. Nella crioglobulinemia di tipo I il crioprecipitato è costituito da una singola immunoglobulina monoclonale completa (IgG, IgA o IgM), più raramente da una singola catena leggera. Il tipo I si riscontra con maggiore frequenza nei pazienti affetti da malattie linfoproliferative, mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldenström. Nella crioglobulinemia di tipo II il crioprecipitato è costituito da IgG policlonali, con funzioni di autoantigene, e IgM monoclonali, più frequentemente di tipo kappa, con attività di fattore reumatoide (IgM-FR). Il tipo II è associato, anch'esso, a malattie linfoproliferative. Il tipo III è costituito da IgG, autoantigene, e IgM-FR policlonali. Sia il tipo II che il tipo III sono riscontrabili in pazienti con malattie autoimmuni e infezioni croniche. Il virus dell'epatite C (HCV) è responsabile della gran parte delle crioglobulinemie non associate a malattie linfoproliferative o autoimmuni che, in tempi non lontani, venivano definite "essenziali". La ricerca delle crioglobuline richiede notevole attenzione nella fase preanalitica ovvero rispettando scrupolosamente la "catena del caldo". La caratterizzazione va effettuata con l'immunofissazione del crioprecipitato.

## Summary

### Cryoglobulins: from science to laboratory practice

Cryoglobulins (CGs) are made up of a mixture of immunoglobulins and complements which typically precipitate at temperatures below normal body temperature (37 °C), and dissolve again if blood is heated. Cryoglobulinemia is often used to refer to a systemic inflammatory syndrome generally involving small-to-medium-vessel vasculitis. Three types of cryoglobulins are recognized, based on whether cryoglobulin is monoclonal and has rheumatoid factor (RF) activity. Type I is a no-RF active monoclonal antibody associated with lymphoma, Waldenström's macroglobulinemia, and multiple myeloma. Both types II and III are called mixed cryoglobulins and are characterized by the presence of RF antibodies which are monoclonal in type II and polyclonal in type III. Type II is associated with lymphoproliferative diseases; both type I and II can occur in patients with rheumatic diseases and chronic infections. C-Hepatitis virus (HCV) is responsible for a large number of cases previously termed as "essential" and not related to lymphoproliferative disorders or autoimmune diseases. Pre-analytical phase is essential to correctly detect CG, as blood samples must be kept constantly warmed. The serum is refrigerated for seven days to allow the precipitate to form, then centrifuged and measured to detect the percentage of precipitate. In order to be reported as a cryoglobulin, the precipitate must at least partially redissolve by heating. Immunofixation allows the typing of precipitated immunoglobulins.

*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

È 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 coniano 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<sup>4</sup>. 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.

## Classificazione

Risale al 1974, da parte di Brouet et al.<sup>5</sup>, l'attuale sistema di classificazione delle crioglobuline, basato principalmente sulla caratterizzazione immunochimica del precipitato. Nella crioglobulinemia di tipo I il crioprecipitato è costituito da una singola immunoglobulina monoclonale completa (IgG, IgA, o IgM) o, più raramente, da una singola catena leggera. Si riscontra con maggiore frequenza nei pazienti affetti da malattie linfoproliferative, mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldenström. Nella crioglobulinemia di tipo II il crioprecipitato è costituito da IgG policlonali, con fun-

zioni di autoantigene, e IgM monoclonali, spesso con catene leggere di tipo kappa, che possiedono attività di fattore reumatoide (IgM-FR). Il tipo II è associato, anch'esso, a malattie linfoproliferative. Il tipo III è determinato da IgG policlonali e IgM-FR policlonali. Sia il tipo II che il tipo III sono riscontrabili in pazienti con malattie autoimmuni e infezioni croniche. Un'alta percentuale di crioglobulinemie di tipo II è associata ad infezione da virus dell'epatite C (HCV correlate), classificate in passato come "Crioglobulinemia Mista Essenziale" (CME)<sup>6-8</sup>. In questi pazienti anticorpi anti-HCV e RNA virale si trovano in alta concentrazione nel crioprecipitato. La difficoltà ad inquadrare in queste classi tutti i riscontri ottenuti dalla criotipizzazione ha portato alcuni autori, agli inizi degli anni 90 del secolo scorso, ad auspicare una classificazione più semplice limitata a due sole classi, in cui la prima classe è costituita dalle forme esclusivamente monoclonali e la seconda, denominata "mista, da tutte le altre forme"<sup>9-12</sup>.

## Manifestazioni cliniche

Nella crioglobulinemia di tipo I prevalgono i segni clinici connessi alla iperviscosità. Il fenomeno di Raynaud è la manifestazione più comune, verificandosi nel 40% dei casi, ma possono anche verificarsi eventi trombotici gravi. La nefropatia è presente in circa un quarto dei casi. Nelle crioglobulinemie di tipo II la manifestazione clinica più frequente è la porpora in circa il 60% dei casi, ma si possono osservare con notevole frequenza sia il fenomeno di Raynaud che la nefropatia. La crioglobulinemia di tipo III è la forma che più frequentemente si presenta con la classica triade: porpora, astenia e artralgie. Molto frequente il fenomeno di Raynaud, abbastanza rara la nefropatia. La neuropatia, dal punto di vista clinico, è presente in meno di un quinto dei casi in tutte le forme di crioglobulinemia; dal punto di vista anatomo-patologico, lesioni si possono reperire con notevole frequenza<sup>13-15</sup>. In Tabella I è riassunta la prevalenza delle principali manifestazioni cliniche in relazione alla classificazione delle crioglobuline.

## Crioprecipitazione

La precipitazione è un fenomeno reversibile, ma le cause e i meccanismi che sottostanno a questo fenomeno sono tuttora poco chiari<sup>16-19</sup>. La insolubilità a freddo è influenzata dalla concentrazione delle immunoglobuline, dal pH e da situazioni emodinamiche. Non vi sono differenze sostanziali tra i fattori che influenzano la precipitazione nelle crioglobuline monoclonali rispetto alle miste<sup>20</sup>. Nelle crioglobulinemie di tipo I la crioprecipitazione sembra essere legata alle caratteristiche della struttura quaternaria della immunoglobulina. Sono state osservate variazioni della composizione aminoacidica, quali basso contenuto in tirosina, triptofano e serina e aumento di acido glutammico. Anche alterazioni del contenuto in carboidrati, in particolare di acido sialico, potrebbero avere un ruolo importante, così

**Tabella I.** Associazione tra sintomi e crioglobulinemie.

Sintomi	Prevalenza generale %	Prevalenza in relazione al tipo di crioglobulinemia %		
		I	II	III
Porpora	55	15	60	70
Necrosi distale	14	40	20	0
Orticaria	10	15	0	10
Livedo reticularis	8	1	0	14
F. di Raynaud	50	40	40	60
Acrocianosi	9	15	15	2
Artralgia	35	5	20	58
Sintomi renali	21	25	35	12
Sintomi neurologici	17	15	5	25

Riprodotta da Milanese et al.<sup>13</sup>.

come ioni quali calcio, bario, manganese e cloro<sup>21,22</sup>. Alcune componenti della risposta flogistica quali la fibronectina e la componente collagene-simile del C1q, potrebbero svolgere un ruolo favorente, alterando la solubilità dell'immunocomplesso. Sono stati identificati dei polimorfismi genici della fibronectina associati a diversi quadri clinici<sup>23</sup>. Nel caso delle crioglobulinemie HCV correlate, il punto cruciale nel processo di crioprecipitazione sembra essere dovuto ad una elevata produzione di IgG dirette contro l'antigene *core* del virus con la capacità di renderlo insolubile a freddo. La simultanea presenza in circolo di IgM-FR è causa, così, del formarsi di complessi immuni crioprecipitabili. Il ruolo delle IgG anticore è determinante, infatti, se i complessi IgM-FR/HCV si trovano in soluzione con anticorpi non specifici, la crioprecipitazione non si verifica. L'ipotesi è che il legame di IgG-anticore con l'antigene virale causi cambiamenti molecolari che portano alla insolubilità a freddo. Anche il legame immunocomplessi-complemento ha un ruolo nel processo di crioprecipitazione, mediata dal legame con il C1q. I meccanismi in causa potrebbero essere: a) la modulazione della risposta delle cellule T tramite il dominio globulare del recettore del C1q (C1qR). b) il legame degli immunocomplessi alla superficie delle cellule endoteliali, ricche di C1qR, determinando così la vasculite<sup>24,25</sup>.

### Eziopatogenesi

Dal punto di vista eziopatogenetico i meccanismi non sono stati ancora completamente chiariti. Le crioglobulinemie di tipo I sono presenti quasi esclusivamente nelle malattie linfoproliferative maligne e potrebbero essere sintetizzate da parte di cloni neoplastici. Le altre forme dipendono dalla cronica stimolazione del sistema immunitario da parte di differenti antigeni. Grande enfasi è stata recentemente attribuita all'HCV come agente eziologico di una serie di alterazioni ematologiche che vanno dalle malattie linfoproliferative alle crioglobulinemie. In Italia, Spagna e Francia e verosimil-

mente anche negli altri Paesi che si affacciano sul Mediterraneo, la prevalenza della sindrome crioglobulinemica nei soggetti infettati dall'HCV è elevata (dal 30 al 50%), mentre nei Paesi anglosassoni tale prevalenza è bassissima (2% circa). È stata riscontrata frequentemente nei pazienti HCV positivi con crioglobulinemia, una mutazione, soprattutto nel genotipo 1B, della proteina dell'envelope virale E2<sup>26-29</sup>. L'infezione cronica da HCV determina una iperattività delle cellule B. L'ingresso del virus nella cellula è mediato dalla proteina E2 del virus e dal recettore cellulare CD 81. L'interazione CD 81-E2 induce l'attivazione e l'espansione delle cellule periferiche CD5+, che determina la produzione di IgM-FR, e una considerevole quota anticorpale policlonale. L'interazione del virus con altri recettori cellulari quali il recettore per le LDL e lo Scavenger Receptor Class B Type 1 (SR-B1) sembrano importanti solo per l'internalizzazione e quindi per l'infezione da HCV, ma non hanno alcun effetto funzionale sui linfociti B o T. È stata dimostrata una traslocazione t14,18 con attivazione dell'oncogene Bcl-2 nei linfociti B dei pazienti HCV positivi. L'iper-espressione della proteina Bcl-2 conferisce alla cellula resistenza all'apoptosi; il quadro che viene a determinarsi, quindi, è caratterizzato da cellule in attiva sintesi di DNA, ma che, essendo resistenti all'apoptosi, sono vecchie e con meccanismi di riparazione genomica non efficienti. Tutto ciò favorisce notevolmente la formazione di cloni neoplastici in quanto il persistere del quadro precedentemente descritto facilita il verificarsi di mutazioni somatiche e la comparsa di monoclonalità<sup>30-33</sup>. Raramente sono state osservate crioglobulinemie in pazienti affetti da epatite da virus B, da virus di Epstein-Barr o da AIDS. I meccanismi di induzione e produzione di crioglobuline in questi casi non sono stati chiariti.

### 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 anticoagulante 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. È 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 biomorale 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>33</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>34,35</sup>. La misura del criocrito può fornire utili indicazioni sulla rispo-

sta alla terapia antivirale così come nell'interpretazione dei test di laboratorio<sup>36</sup>. L'utilità è particolarmente evidente nei dosaggi proteici che sono spesso falsati in loro presenza.

- È importante ai fini diagnostici e classificativi effettuare la tipizzazione del crioprecipitato: a questo scopo va lavato 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 poliacrilamide 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>37</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>38</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-complessi 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 evidenzia-

ta 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. Meltzer M, Franklin EC, Elias K, McCluskey RT, Cooper N. Cryoglobulinemia: a clinical and laboratory study. II. Cryoglobulins with rheumatoid factor activity. *Am J Med* 1966; 40:837-56.
5. Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann M. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 1974; 57:775-88.
6. Dammacco F, Sansonno D. Antibodies to hepatitis C virus in essential mixed cryoglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 1992; 87:352-6.
7. Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1992; 327:1490-5.
8. Marcellin P, Descamps V, Martinot-Peignoux M, Larzul D, Xu L, Boyer N, et al. Cryoglobulinemia with vasculitis associated with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1993; 104:272-7.
9. Bellotti V, Zorzoli I, Bossi A, Rancati E, Salvadeo A, Merlini G, et al. Immunochemical characteristics of a particular cryoglobulin. A new cryoglobulin subgroup? *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9:399-402.
10. Musset L, Diemert MC, Taibi F, Thi Huong Du L, Cacoub P, Leger JM, et al. Characterization of Cryoglobulins by Immunoblotting. *Clin Chem* 1992; 38:798-802.
11. Gorevic PD, Galanakis D, Finn AF Jr. Cryoglobulins. In: Rose NR, de Nacario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 5th edn. Washington, DC: ASM Press; 1997. p. 217-23.
12. Kallemuchikkal U, Gorevic PD. Evaluation of cryoglobulins. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123:119-25.
13. Milanesi B, Tani M, Ciapini A. L'immunofissazione nella diagnostica di laboratorio. *Testo-atlante*. Padova: Piccin; 2004. p. 146-7.
14. Migliaresi S, Di Iorio G, Ammendola A, Ambrosone L, Sanges G, Ugolini G, et al. Peripheral nervous system involvement in HCV-related mixed cryoglobulinemia. *Reumatismo* 2001; 53:26-32.
15. Morra E. Cryoglobulinemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:368-72.
16. Ramsland PA, Terzyan SS, Cloud G, Bourne CR, Farrugia W, Tribbick G, et al. Crystal structure of a glycosylated Fab from an IgM cryoglobulin with properties of a natural proteolytic antibody. *Biochem J* 2006; 395:473-81.
17. Yagi H, Takahashi N, Yamaguchi Y, Kato K. Temperature dependent isologous Fab-Fab interaction that mediates cryocrystallization of a monoclonal immunoglobulin G. *Mol Immunol* 2004; 41:1211-5.
18. Kuroda Y, Kuroki A, Kikuchi S, Funase T, Nakata M, Izui S. A critical role for sialylation in cryoglobulin activity of murine IgG3 monoclonal antibodies. *J Immunol* 2005; 175:1056-61.
19. 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.
20. Lawson EQ, Brandau DT, Trautman PA, Aziz SE, Midhaugh CR. Kinetics of the precipitation of cryoimmunoglobulins. *Mol Immunol* 1987; 24:897-905.
21. Qi M, Steiger G, Schifferli JA. A calcium-dependent cryoglobulin IgM kappa/polyclonal IgG. *J Immunol* 1992; 149:2345-51.
22. Di Stasio E, Bizzarri P, Casato M, Galtieri A, Fiorilli M, Pucillo LP. Cl-regulates cryoglobulin structure: a new hypothesis for the physiopathological mechanism of temperature non-dependent cryoprecipitation. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:614-20.
23. Fabris M, Quartuccio L, De Re V, Pozzato G, Mazzaro C, Tavoni A, et al. Fibronectin gene polymorphisms and clinical manifestations of mixed cryoglobulinemic syndrome: increased risk of lymphoma associated to MspI DD and HaeIII AA genotypes. *Reumatismo* 2008; 60:28-34.
24. Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol* 2001; 167:5264-72.
25. Sansonno D, Dammacco F. Hepatitis C virus, cryoglobulinaemia, and vasculitis: immune complex relations. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:227-36.
26. Donada C, Cruicitti A, Donadon V, Tommasi L, Zanette G, Crovatto M, et al. Systemic manifestations and liver disease in patients with chronic hepatitis C and type II or III mixed cryoglobulinaemia. *J Viral Hepat* 1998; 5:179-85.
27. Lee YH, Ji JD, Yeon JE, Byun KS, Lee CH, Song GG. Cryoglobulinaemia and rheumatic manifestations in patients with hepatitis C virus infection. *Ann Rheum Dis* 1998; 57:728-31.
28. Horcajada JP, Garcia-Bengoechea M, Cilla G, Etxaniz P, Cuadrado E, Arenas JI. Mixed cryoglobulinaemia in patients with chronic hepatitis C infection: prevalence, significance and relationship with different viral genotypes. *Ann Med* 1999; 31:352-8.
29. Lit LCW, Chan MHM, Cheung RC, Ho C, Law I, Lam C, et al. Cryoglobulins: identification and clinical significance. *Clin Biochem Rev* 2000; 21:89-92.
30. Curry MP, Golden-Mason L, Doherty DG, Deignan T, Norris S, Duffy M, et al. Expansion of innate CD5pos B cells expressing high levels of CD81 in hepatitis C virus infected liver. *J Hepatol* 2003; 38:642-50.
31. Machida K, Cheng KT, Pavio N, Sung VM, Lai MM. Hepatitis C virus E2-CD81 interaction induces hypermutation of the immunoglobulin gene in B cells. *J Virol* 2005; 79:8079-89.
32. Zignego AL, Ferri C, Giannelli F, Giannini C, Caini P, Monti M, et al. Prevalence of BCL-2 rearrangement in hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia with or

- without complicating B-cell lymphoma. *Ann Intern Med* 2002; 137:571-80.
33. 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.
  34. Amdo TD, Welker JA. An approach to the diagnosis and treatment of cryofibrinogenemia. *Am J Med* 2004; 116:332-7.
  35. Ferri C, Antonelli A, Mascia MT, Sebastiani M, Fallahi P, Ferrari D, et al. HCV-related autoimmune and neoplastic disorders: the HCV syndrome. *Dig Liver Dis* 2007; 39(Suppl 1):S13-21.
  36. Von Ahsen N, Ehrlich B, Scott CS, Riggert J, Oellerich M. Cryoglobulins interfere with platelet counts by optical and impedance methods but not with the CD61 immunoplatelet count. *Clin Chem* 2001; 47:1858-60.
  37. Ferri C, Zignego AL, Pileri SA. Cryoglobulins (review). *J Clin Pathol* 2002; 55:4-13.
  38. 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.