

Ricerca, quantificazione e caratterizzazione delle crioglobuline: indicazioni per un protocollo condiviso

Gabriella Passerini¹, Umberto Basile² per il Gruppo di Studio SIBioC Proteine

¹Diagnostica e Ricerca San Raffaele S.p.A., IRCCS San Raffaele, Milano

²Laboratorio di Immunologia, Istituto di Patologia Generale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

ABSTRACT

Recommendations for a protocol to detect, quantify and characterize cryoglobulins. Cryoglobulins are immunoglobulins that precipitate out of serum at temperature $<37^{\circ}\text{C}$ and resolubilize on warming. The clinical syndrome for cryoglobulinemia typically includes purpura, weakness and arthralgias, but also underlying disease may contribute to symptoms. Cryoglobulin testing is carried out on blood sample collected, transported, clotted and spun at 37°C , before the precipitate is allowed to form in serum stored at 4°C in a Wintrobe tube for at least 7 days. The most important confounding factor affecting cryoglobulin test is the preanalytical phase not fully done at 37°C . The easiest way to quantify cryoglobulins is the cryocrit estimate, directly measured in the Wintrobe tube. However, this approach shows low accuracy and sensitivity. Furthermore, the precipitate should be resolubilized by warming to confirm that it is truly formed by cryoglobulins. Characterization of cryoglobulins requires several washing of the precipitate before immunofixation, technique by which cryoglobulins can be classified according to Brouet into three types depending from the characteristics (monoclonal vs. polyclonal) of the detected immunoglobulins. We suggest a wider classification of cryoglobulins undertaking also the microheterogeneous and biclonal patterns detected by high resolution immunoelectrophoretic techniques.

INTRODUZIONE

La ricerca, quantificazione e caratterizzazione delle crioglobuline (CRG) sono analisi essenziali per la diagnosi e il monitoraggio clinico e terapeutico dei pazienti affetti da sindromi crioglobulinemiche. Esse vanno ricercate solo nei pazienti sintomatici caratterizzati dalla triade di Meltzer-Franklin (artralgia, astenia e porpora).

E' fondamentale disporre di tecniche analitiche sensibili e precise, adeguatamente standardizzate e praticabili in ogni laboratorio ospedaliero. Il principale ostacolo per la standardizzazione delle procedure analitiche risiede nell'eterogeneità delle CRG, che presentano caratteristiche di solubilità, termosensibilità e cinetica di precipitazione estremamente variabili (1, 2).

Questo lavoro ha l'obiettivo di definire un protocollo per la ricerca delle CRG relativo a modalità di prelievo, separazione del campione, tempo di osservazione e misurazione del crioprecipitato. Vengono in seguito esaminate le procedure di trattamento del crioprecipitato preparative alla caratterizzazione immunologica, con particolare attenzione alle criticità insite nella fase di lavaggio, dalla cui efficacia dipende la purificazione delle CRG e la corretta tipizzazione delle immunoglobuline che costituiscono il crioprecipitato. Infine alla luce delle più recenti acquisizioni eziopatogenetiche e del riscontro sempre più frequente di profili immunochimici non riconducibili alla classificazione di Brouet, risultato dell'affinamento delle tecniche analitiche di immunotipizzazione, viene proposta una revisione della tassonomia delle crioglobulinemie.

RICERCA DELLE CRIOGLOBULINE

Il termine crioglobulinemia definisce la presenza nel siero di una o più immunoglobuline mono e/o policlonali, che precipitano o gelificano in modo reversibile a temperature inferiori a 37°C . Le CRG di tipo I sono monoclonali, conseguenti a un processo linfoproliferativo, e si riscontrano quasi esclusivamente in patologie maligne, quali mieloma multiplo e macroglobulinemia di Waldenström. La loro precipitazione a freddo potrebbe dipendere da modificazioni della composizione amminoacidica o del contenuto in carboidrati delle immunoglobuline monoclonali. Nelle crioglobulinemie di tipo II e III o crioglobulinemie miste (CrM), la precipitazione è invece legata ad un'interazione fra le immunoglobuline coinvolte più che a specifiche caratteristiche delle singole immunoglobuline. Le CrM sono immunocomplessi in cui solitamente l'antigene è una immunoglobulina G (IgG) e l'anticorpo con attività reumatoide anti-IgG è una immunoglobulina M (IgM) mono o policlonale (3-7). La ricerca di CRG dovrebbe essere effettuata solo in soggetti con sintomi clinici o dati di laboratorio suggestivi, poiché l'osservazione di crioglobulinemie transitorie e asintomatiche si associa frequentemente a numerose patologie che innescano un'iperstimolazione delle cellule linfocitarie B, patologie infiammatorie, neoplastiche e infettive a diversa eziologia (5, 6).

Raccolta del campione

La raccolta del campione di sangue richiede l'uso di provette senza anticoagulanti, mantenute prima e dopo il prelievo a 37°C per almeno 30 min fino a completa

coagulazione del campione (8, 9). E' sconsigliato l'uso di provette con gel separatore per il rischio di un eventuale rilascio di sostanze interferenti durante l'incubazione a 37 °C. Qualora non siano disponibili provette senza gel separatore è opportuno richiedere al fornitore informazioni specifiche sulle caratteristiche del gel utilizzato.

Il volume minimo di sangue necessario è 10 mL (9). Un volume inferiore di siero può comportare il rischio di non rilevare CRG presenti a bassa concentrazione, potenzialmente associate a sintomatologie severe (7, 10). Alcuni Autori enfatizzano la necessità di centrifugare a 37 °C il campione ematico e suggeriscono, qualora non sia disponibile una centrifuga riscaldata, in alternativa di separare il siero dal coagulo senza previa centrifugazione (8). Altri ritengono che solo per i pazienti con CRG di tipo I sia necessario mantenere costantemente il sangue a 37 °C fino a separazione del siero dal coagulo, mentre i campioni di sangue di pazienti con CrM possono essere gestiti anche a temperatura ambiente (10). Kallemuchikkal suggerisce di centrifugare il sangue coagulato a 2500 rpm per 10 min a 37 °C (9), Musset suggerisce 2000 g per 30 min a 37 °C (11), Brouet e Dammacco raccomandano di centrifugare alla temperatura di 37 °C, ma non specificano tempo e velocità di centrifugazione (4, 12) perché, in realtà, questi non rappresentano fattori critici per le analisi successive.

Osservazione del campione

Dopo la centrifugazione, il campione di siero surnatante viene trasferito in provette graduate di Wintrobe e incubato a 4 °C. Il processo di precipitazione si manifesta in modo estremamente vario nei diversi campioni, dipendendo dalla concentrazione delle CRG presenti, e può richiedere poche ore quando le CRG, spesso di tipo I, diventano insolubili già a temperatura ambiente o può evidenziarsi dopo tempi molto lunghi, in particolare nel caso di CRG di tipo III presenti a basse concentrazioni. Il parametro critico dell'analisi è il tempo di osservazione a 4 °C che deve essere stabilito in modo adeguato per rendere evidenti anche le CRG presenti nel siero in concentrazioni molto basse (9, 10).

Per la corretta esecuzione della ricerca di CRG il campione di siero deve essere mantenuto a 4 °C per almeno 7 giorni e durante l'intero periodo di osservazione non deve essere mai congelato e scongelato per evitare significative variazioni di solubilità delle immunoglobuline (9, 11).

Metodi rapidi di screening

Varie metodiche, anche poco attendibili, hanno proposto la riduzione dei tempi di precipitazione (13). Una tecnica di semplice attuazione, ma non ancora validata, propone un metodo rapido per evidenziare la presenza di CRG, che consiste nella misura in spettrofotometria alla lunghezza d'onda di 350 nm dell'aggregazione degli immunocomplessi che si formano nel siero incubato a 10 °C (14).

Verifica degli artefatti

Per definizione, le CRG precipitano o gelificano in modo reversibile a temperature inferiori a 37 °C; pertanto per confermare la termoreversibilità del processo è opportuno o ridissolvere il crioprecipitato a 37 °C per 1 ora dopo averne effettuato la quantificazione o allestire in parallelo un'aliquota di siero da mantenere a 37 °C per 7 giorni (4, 9, 11). In particolare i pazienti in terapia anticoagulante possono presentare crioprecipitati costituiti da complessi eparina-fibronectina o complessi fibrinogeno-fibrina di morfologia analoga alle CRG. In questi casi, per non incorrere nell'attribuzione di falsi positivi, è opportuno eseguire l'immunotipizzazione del crioprecipitato per dimostrare la presenza di immunoglobuline (9, 15).

QUANTIFICAZIONE DEL CRIOPRECIPITATO

La quantificazione delle CRG può essere espressa come criocrito (CRT), come misura delle proteine totali, come misura immunonefelometrica delle immunoglobuline o come misura dell'area sottesa alla zona γ -globulinica dopo elettroforesi del crioprecipitato risolubilizzato a 37 °C.

Criocrito

Il CRT è il parametro semiquantitativo comunemente usato, semplice ed economico, ma affetto da numerose variabili che ne sconsigliano l'uso come parametro di confronto tra diversi pazienti o come indicatore di attività delle patologie associate. Il CRT esprime il rapporto percentuale tra volume di crioprecipitato e volume di siero dopo centrifugazione a 4 °C per 15 min a 1700 rpm, valutati mediante ispezione visiva (9). La quantificazione delle CRG così effettuata è poco accurata, poco specifica e ha una bassa sensibilità. I fattori limitanti della misura del CRT sono il tipo di provette utilizzate per la misura, le condizioni di centrifugazione applicate, la necessità di incubare un volume elevato di siero per ottenere un dato attendibile, il presupposto che ci sia correlazione tra la concentrazione delle diverse proteine nel crioprecipitato e il volume di sedimentazione. Inoltre, poiché la misura non viene eseguita su CRG lavate, il valore di CRT può essere fortemente alterato, in diversa misura, dalla presenza di sieroproteine intrappolate nel crioprecipitato (9, 10). Nonostante ciò, il CRT viene molto utilizzato negli studi clinici pubblicati e resta comunque il dato quantitativo raccomandato in letteratura.

Misura delle proteine totali

Il dosaggio delle proteine totali è un metodo alternativo di misura del crioprecipitato, che non è stato ancora validato; consente di stimare la concentrazione delle CRG, ma è fortemente influenzato dalla presenza di altre proteine nel crioprecipitato quali albumina, fibronectina, C1q e altri fattori del complemento. La misura delle proteine totali richiede un accurato lavaggio del

crioprecipitato per eliminare le proteine coprecipitate e la completa risolubilizzazione delle CRG; ha il vantaggio di una maggiore sensibilità rispetto al CRT poiché permette di valutare anche crioprecipitati adesi al fondo del tubo di Wintrobe, che sfuggono all'ispezione visiva. Musset et al. (11) determinano le proteine totali del crioprecipitato mediante misura spettrofotometrica a 280 nm dopo dissoluzione in NaOH 0,1 mmol/L; Brouet et al. (4) effettuano la dissoluzione delle CRG in acido acetico 0,1 mol/L. Shiahabi effettua una misura colorimetrica delle proteine del crioprecipitato con rosso di pirogallolo o blu Coomassie a partire da 1 mL di siero incubato a 4 °C per 3 giorni, centrifugato a 5000 rpm per 5 min a 4 °C, per separare le CRG dal siero surnatante, lavate 3 volte con 3 mL di acqua fredda e dissolte in 1 mL di soluzione fisiologica a 37 °C (10). L'eventuale contaminazione da sieroproteine residue viene rilevata con il dosaggio nefelometrico dell'albumina. Studi recenti riportano per le proteine totali del crioprecipitato valori di riferimento <20 mg/L (10).

Determinazione immunonefelometrica delle immunoglobuline

Un altro dato quantitativo sperimentale si ottiene misurando con metodo nefelometrico la differenza tra la concentrazione delle immunoglobuline dosate a 37 °C su campione nativo e quella determinata a temperatura ambiente sul siero surnatante dopo crioprecipitazione (9).

Elettroforesi del crioprecipitato

Una corsa elettroforetica del crioprecipitato risolubilizzato a 37 °C in elettroforesi capillare o in gel d'agarosio consente di quantificare le CRG in modo accurato misurando l'area corrispondente alla zona γ -globulinica del tracciato elettroforetico del crioprecipitato e sottraendo ad essa la quota di siero-globuline coprecipitate, in base alla quantità di albumina residua. In pratica l'albumina residua viene utilizzata come fattore di correzione nella misura del crioprecipitato, mediante il calcolo del rapporto γ -globuline/albumina del crioprecipitato rispetto al rapporto γ -globuline/albumina del siero nativo (16). L'elettroforesi permette anche di ricavare indicazioni sul fenotipo delle CRG prima di procedere alla immunocaratterizzazione (10, 16).

CARATTERIZZAZIONE DEL CRIOPRECIPITATO

Lavaggio del crioprecipitato

L'eliminazione delle proteine sieriche residue prima della caratterizzazione del crioprecipitato costituisce una fase fondamentale per la corretta interpretazione del profilo immunoelettroforetico. Il crioprecipitato può essere lavato con soluzione fisiologica o con tampone fosfato (PBS) o con PBS contenente polietilenglicole (PEG) 6000 al 3% (4, 9, 11). In tutti i casi la soluzione di lavaggio deve essere fredda (4 °C), le CRG devono essere ridissolte per agitazione con un volume di soluzione pari a quello del siero surnatante eliminato dopo

centrifugazione a 4 °C, quindi separate nuovamente dalla soluzione per centrifugazione a 4 °C. Le condizioni di centrifugazione e il numero di cicli di lavaggio da effettuare variano notevolmente nei lavori esaminati. Il consenso si raggiunge stabilendo che il numero minimo di cicli di lavaggio è tre, ma è opportuno aumentarne il numero in presenza di criocrito >4%. Quando il crioprecipitato è scarso (<1%) è consigliabile dopo ogni ciclo di lavaggio recuperare il campione con una incubazione "overnight" a 4 °C, prima di procedere al lavaggio successivo (4). Se le CRG non si dissolvono nella soluzione di lavaggio per agitazione è opportuno incubarle a 37 °C fino a completa solubilizzazione, quindi recuperare il campione con una incubazione "overnight" a 4 °C prima di procedere al lavaggio successivo (4). In rari casi le comuni soluzioni di lavaggio possono dissolvere in modo irreversibile il crioprecipitato rendendo impossibile il recupero delle CRG per la tipizzazione (17).

Dissoluzione del crioprecipitato

Il crioprecipitato lavato viene dissolto mediante incubazione a 37 °C (9). Per eliminare le interazioni tra le immunoglobuline che costituiscono l'immunocomplesso può essere vantaggioso trattare le CRG con soluzioni riducenti (acetilcisteina al 10%, β -mercaptoetanolo al 1%, ditiotreitolo 0,5 mol) (18).

Tipizzazione del crioprecipitato

L'immunocaratterizzazione del crioprecipitato, inizialmente effettuata da Brouet mediante immunoelettroforesi, viene eseguita attualmente con metodologie più sensibili, quali l'immunofissazione su gel d'agarosio, che rappresenta il "gold standard", l'immunosottrazione in elettroforesi capillare, l'"immunoblotting" e l'elettroforesi bidimensionale in gel di poliacrilamide (10, 19-21).

REFERTAZIONE

Nel 1974 Brouet et al. proposero una classificazione che correlava le caratteristiche immunochimiche delle crioglobulinemie con i quadri clinici (Tabella 1) (4). Nella crioglobulinemia di tipo I prevalgono i segni clinici della malattia linfoproliferativa sottostante e la crioglobulinemia costituisce spesso un reperto casuale; tuttavia, non sono infrequenti segni di occlusione vascolare, associati con una sindrome da iperviscosità e lesioni purpuriche e distrofiche della cute, solitamente localizzate agli arti inferiori. Le CrM presentano un quadro clinico caratterizzato da porpora, astenia e artralgie a cui possono associarsi patologie d'organo indotte dalle CRG, quali nefropatie e neuropatie periferiche e danni d'organo indipendenti dalle CRG, quali epatopatie e linfoproliferazione.

L'applicazione di metodologie più sensibili quali l'immunofissazione, l'"immunoblotting" e l'elettroforesi bidimensionale in gel di poliacrilamide ha permesso di identificare pazienti con CRG definite microeterogenee. Il concetto di microeterogeneità è un elemento innovativo dal punto di vista tassonomico introdotto da Musset et

Tabella 1

Classificazione delle crioglobuline secondo Brouet e principali associazioni cliniche dei tre tipi identificati

Tipo	I	II	III
Frequenza	25-30%	25%	50%
Specificità	Monoclonale	Monoclonale anti-IgG	Policlonale anti-IgG
Classe di immunoglobuline	IgM (prevalente) IgG (IgG2,IgG3) IgA (rare) Catene leggere	IgM vs. IgG IgG vs. IgG IgA vs. IgG (rare)	IgG-IgM IgM-IgG-IgA IgG-IgA-Catene leggere

Patologie associate

Crioglobuline Tipo I

- Mieloma multiplo
- Macroglobulinemia di Waldenström
- Malattie linfoproliferative con componente monoclonale

Crioglobuline Tipo II

- Infezione cronica da epatite C
- Leucemia linfocitica cronica
- Linfoma non-Hodgkin
- Patologie autoimmuni (sindrome di Sjögren)
- Malattia da agglutinine fredde

Crioglobuline Tipo III

Infezioni croniche:

- virali (virus di Epstein-Barr, citomegalovirus, HIV e virus B e C dell'epatite)
- batteriche (endocarditi batteriche subacute, spirochete)
- fungine
- parassitosi

Patologie autoimmuni:

- lupus eritematoso sistemico
- artrite reumatoide
- malattie infiammatorie dell'intestino
- cirrosi biliare

Tabella 2

Proposta per una nuova classificazione delle crioglobulinemie

Tipo I	Una Ig monoclonale
Tipo II	Una o più Ig monoclonali + Ig policlonali
Tipo III	Ig policlonali, Ig oligoclonali + Ig policlonali (microeterogenee)

al. (11) e consiste nella presenza di due o più bande oligoclonali in CrM, ritenute forme intermedie tra tipo III e tipo II. Analoghi risultati sono stati riscontrati anche da Tissot (20, 21) in pazienti con crioglobulinemie in tracce.

Nel 1997 Pontet et al. (22) hanno descritto un nuovo profilo immunochimico in un soggetto affetto da sindrome di Gougerot-Sjögren, costituito da una componente biclonale IgM e da IgG policlonali. Gli Autori hanno suggerito di dividere in due sottogruppi le CRG di tipo II:

- 1) tipo IIa, caratterizzato dalla presenza di una sola componente monoclonale;
- 2) tipo IIb, caratterizzato dalla presenza di più componenti monoclonali.

In uno studio successivo, Le Carrer ha ampliato la definizione della classe IIb, inglobando in questa sotto-classe anche le CRG oligoclonali secondo Musset (18). In generale, i progressi tecnologici hanno reso disponibili metodi più specifici e sensibili per la tipizzazione delle CRG, consentendo di completare la classificazione di Brouet senza modificarla sostanzialmente (22, 23). L'ipotesi che l'infezione da virus dell'epatite C potesse avere un ruolo importante nell'indurre e mantenere la crioglobulinemia, con eventuale evoluzione nel tempo da tipo III a tipo II è stata confermata da altri Autori (7, 24, 25).

L'inserimento di un nuovo tipo rappresentativo di una fase di transizione tra le CRG di tipo II e III e di un nuovo sottotipo di CRG costituisce un progresso di conoscenze che sollecita particolare attenzione verso gli aspetti clinici, istopatologici e di "follow-up", con indicazioni diagnostiche e terapeutiche adeguate, differenti per ogni momento dell'evoluzione. Per questa ragione, alla luce delle conoscenze attuali, la classificazione delle CRG potrebbe essere integrata come illustrato nella Tabella 2.

APPENDICE

Riassunto del protocollo proposto per la ricerca, quantificazione e caratterizzazione delle crioglobuline

Modalità di prelievo

- 10 mL di sangue posto immediatamente a 37 °C,
- Lasciar coagulare il sangue a 37 °C per almeno 30 min,
- Centrifugare a 2500 rpm per 10 min a 37 °C,
- Separare immediatamente il siero in tubo di Wintrobe e incubare a 4 °C.

Valutazione del crioprecipitato

- Osservare l'eventuale presenza nel siero di precipitati, flocculati o gel dopo 7 giorni di incubazione a 4 °C,
- Verificare la reversibilità della crioprecipitazione ponendo il siero a 37 °C per 1 ora o in alternativa valutare l'aspetto di un'aliquota dello stesso campione mantenuta in parallelo a 37 °C per 7 giorni.

Misura del crioprecipitato

- **Criocrito:** rapporto percentuale tra volume di crioprecipitato e volume di siero dopo centrifugazione a 1700 rpm per 15 min a 4 °C ("gold standard"),
- **Proteine totali:** dopo 3-6 lavaggi con 10 volumi di tampone PBS o soluzione fisiologica (valori di riferimento ≤20 mg/L),
- **IgG, IgA, IgM:** misura eseguita in nefelometria su siero nativo a 37 °C e dopo crioprecipitazione su siero surnatante,
- **Elettroforesi:** su siero nativo e su crioprecipitato risospeso a 37 °C.

Caratterizzazione del crioprecipitato

- **Lavaggio:** 3 cicli di lavaggio a 4 °C con soluzione fisiologica o tampone PBS, centrifugazione a 2000 rpm per 15 min a 4 °C,
- **Dissoluzione:** incubazione a 37 °C e/o trattamento con sostanze riducenti (acetilcisteina 10%, β-mercaptoetanolo 1%, ditiotritolo 5 mol),
- **Tipizzazione:** immunofissazione su gel d'agarosio ("gold standard"), immunosottrazione in elettroforesi capillare, "immunoblotting", elettroforesi bidimensionale in gel di poliacrilamide.

BIBLIOGRAFIA

1. Gorevic PD, Kassab HJ, Levo Y, et al. Mixed cryoglobulinemia: clinical aspects and long-term follow-up of 40 patients. *Am J Med* 1980;69:287-30.
2. Brandau DT, Trautman PA, Steadman BL, et al. The temperature-dependent stoichiometry of mixed cryoimmunoglobulins. *J Biol Chem* 1986;261:16385-91.
3. Wintrobe MM, Buell MV. Hyperproteinemia associated with multiple myeloma with report of a case in which an extraordinary hyperproteinemia was associated with thrombosis on the retinal veins and symptoms suggesting Raynaud's disease. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1933;52:156-65.
4. Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, et al. Biological and clinical significance of cryoglobulins. *Am J Med* 1974;57:775-88.
5. Invernizzi F, Galli M, Serino G, et al. Secondary and essential cryoglobulinemias. *Acta Haematol* 1983;70:73-82.
6. Monti G, Galli M, Invernizzi F, et al. Cryoglobulinemias: a multi-centre study of the early clinical and laboratory manifestations of primary and secondary disease. *QJM* 1995;88:115-26.
7. Ferri C, Zignego AL, Pileri A. Cryoglobulins. *J Clin Pathol* 2002;55:4-13.
8. Bakker AJ, Slomp J, de Vries T, et al. Adequate sampling in cryoglobulinaemia: recommended warmly. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:85-9.
9. Kallemuchikkal U, Gorevic PD. Evaluation of cryoglobulins. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:119-25.
10. Shihabi ZK. Cryoglobulins: an important but neglected clinical test. *Ann Clin Lab Sci* 2006;36:395-408.
11. Musset L, Diemert MC, Taibi F, et al. Characterization of cryoglobulins by immunoblotting. *Clin Chem* 1992;38:798-802.
12. Dammacco F, Sansonno D, Piccoli C, et al. The cryoglobulins: an overview. *Eur J Clin Invest* 2001;31:628-38.
13. McLeod BC, Sassetti RJ. Hypocryoglobulins: enhanced cryoprecipitation from hypotonic serum in patients with vasculitis. *Arch Int Med* 1984;144:1381-5.
14. Di Stasio E, Bizzarri, Bove M, et al. Analysis of the dynamics of cryoaggregation by light-scattering spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:152-8.
15. Fornasieri A, Armelloni S, Bernasconi P, et al. High binding of immunoglobulin M kappa rheumatoid factor from type II cryoglobulins to cellular fibronectin: a mechanism for induction of in situ immune complex glomerulonephritis? *Am J Kidney Dis* 1996;27:476-83.
16. Shihabi ZK. Analysis and general classification of serum cryoglobulins by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 1996;17:1607-12.
17. André M, Mahammedi H, Aumaitre O, et al. A "missed" cryoglobulin: the importance of in vitro calcium concentration. *Ann Rheum Dis* 2000;59:490.
18. Le Carrer D. Cryoglobulinemias: proposition d'un protocole d'exploration biologique. Actualisation de leur classification. *Feuillets biol* 1998;39/221:55-65.
19. Bellotti V, Zorzoli I, Bossi A, et al. Immunochemical characteristics of a particular cryoglobulin. A new cryoglobulin subgroup? *Clini Exp Rheumatol* 1991;9:399-402.
20. Tissot JD, Schifferli JA, Hochstrasser DF, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of cryoglobulins and identification of an IgM-associated peptide. *J Immunol Methods* 1994;173:63-75.
21. Tissot JD, Pietrogrande M, Testoni L, et al. Clinical implications of the types of cryoglobulins determined by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Haematologica* 1998;83:693-700.
22. Pontet F, Halimi C, Brocard A, et al. Biclinal immunoglobulin M dysglobulinaemia: evolving aspects in a case of primary Sjogren syndrome. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:287-90.
23. Oliver M, Coton T, Ragot C, et al. Les cryoglobulinemies. *Ann Biol Clin* 2004;62:521-8.
24. Ferri C, Zignego AL. Relation between infection and autoimmunity in mixed cryoglobulinemia. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:53-60.
25. Eng MA, Kallemuchikkal U, Gorevic PD. Hepatitis C virus, autoimmunity and lymphoproliferation. *Mt Sinai J Med* 2000;67:120-32.