Crioglobuline: un esame da raccomandare “caldamente”

Alberto Dolci
Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera ‘Luigi Sacco’, Milano

In questo numero di *Biochimica Clinica* sono pubblicati le raccomandazioni del Gruppo di Studio SIBioC Proteine (GdS-P) sulla ricerca, quantificazione e caratterizzazione delle crioglobuline (1) e un contributo di Cesati et al. (2), che suggerisce la richiesta sistematica della ricerca delle crioglobuline come esame di approfondimento in tutti i soggetti ai quali venga per la prima volta rilevata una componente monoclonale.

Perché la ricerca delle crioglobuline, un esame di laboratorio apparentemente così semplice, legato ad un fenomeno biochimico complesso e affascinante come la precipitazione di proteine nel siero posto ad una temperatura <37 °C e la loro completa ridissoluzione nel campione nuovamente riscaldato, suscita così tanto interesse? I motivi sono probabilmente molteplici, anche se almeno tre sono quelli chiave: 1) la mancanza di standardizzazione, non solo del metodo di analisi, ma anche di tutti gli aspetti pre-analitici e post-analitici (classificazione e refertazione), 2) le peculiarità del meccanismo fisiopatologico, e 3) le importanti ricadute cliniche che la loro eventuale presenza comporta.

Nell’epoca in cui per il laboratorio clinico la standardizzazione delle misure, o almeno delle corrispondenti procedure, è un traguardo irrinunciabile da perseguire, appare quantomeno inatteso che per la ricerca, la quantificazione e la caratterizzazione delle crioglobuline non sia stata pubblicata da alcuna società scientifica di rilievo internazionale una linea guida, ma siano solamente disponibili rassegne narrative sull’argomento che, per quanto interessanti ed esaustive, non sono largamente divulgate, né univoche sulle procedure da seguire (3, 4). In questo senso, il documento del GdS-P, che descrive un protocollo operativo per l’esecuzione di questo esame, fornisce, almeno a livello nazionale, una necessaria schiarita in un cielo oltremodo nebuloso.

E’ pensabile di standardizzare veramente questo esame? Probabilmente no, prima di tutto perché è molto difficile, se non impossibile, definire l’analita “crioglobuline”, in quanto non tutte le crioglobuline precipitano, ma alcune di queste gelificano o cristallizzano a temperature <37 °C, senza per questo modificare le loro caratteristiche eziopatogenetiche. Inoltre, anche le crioglobuline che precipitano possono essere costituite da più tipi di proteine, non solo da immunoglobuline, libere o aggregate tra loro, e formare quindi una miscela eterogenea per la quale il miglior approccio analitico è probabilmente la determinazione spettrofotometrica delle proteine totali del crioprecipitato, opportunamente lavato e ridissolto a 37 °C, con un metodo di adeguata sensibilità analitica (rosso di pirogallolo o blu Coomassie).

Relativamente alla fase pre-analitica, è richiesto il prelievo e il trasporto del campione a 37 °C, in quanto anche piccoli abbassamenti della temperatura possono portare ad una sottostima delle crioglobuline, con il rischio di risultati falsamente negativi nella loro ricerca. Ma è questa ben nota procedura preanalitica veramente sempre rispettata, come si dà per scontato con una buona dose di presunzione? Sembrerebbe proprio di no, almeno a giudicare dai dati del questionario inviato a 140 laboratori europei partecipanti al “UK National External Quality Assurance Scheme” (UKNEQAS) (5). Infatti, solo il 36% dei laboratori intervistati dichiarava di utilizzare una procedura standardizzata per garantire il mantenimento del campione a 37 °C fino alla separazione del siero, percentuale che sale ad un poco meno sconsolante 51% in Italia in un’analoga indagine condotta dal GdS-P nel corso del 2008 su 56 laboratori (dati non pubblicati). E’ indubbio che in un’epoca di consolidamento delle attività specialistiche di laboratorio e di corrispondente, a volte capillare, decentramento dei punti prelievo, questo aspetto vada gestito con particolare attenzione.

Per la parte analitica, il tempo di osservazione del campione posto a 4 °C è un parametro decisamente critico, che però, nel questionario inviato ai partecipanti al UKNEQAS, variava da 12 ore a 9 giorni (con una mediana di 3 giorni) (5) e nella verifica condotta dal GdS-P variava da 3 a 15 giorni. Circa il 70% dei laboratori italiani, prima di confermare la negatività del campione o di stimare il criocrito nei campioni positivi, mantiene già il siero a 4 °C per almeno 7 giorni, come specificato nelle raccomandazioni del GdS-P (1). In questo caso, potrebbe forse essere utile controllare quotidianamente la precipitazione di crioglobuline nel siero a 4 °C per riportare tempestivamente la positività di un soggetto, anche perché uno degli aspetti che limitano la richiesta della ricerca di crioglobuline è proprio il tempo necessario per il completamento dell’esame (4). A questo proposito, sono stati valutati nuovi approcci metodologici per la determinazione spettrofotometrica, turbidimetrica o nefelometrica delle crioglobuline che, oltre ad una drastica riduzione del tempo totale di analisi, potrebbero anche offrire migliori sensibilità e riproducibilità analitiche rispetto alla stima del criocrito. Tuttavia, siamo ancora lontani dalla loro definitiva validazione analitica e soprattutto clinica. In tema di criocrito, l’inaccuratezza della sua misura comporta un’inaccettabile variabilità interlaboratorio. Il primo passo verso un’armonizzazione di questa stima è la standardizzazione dei parametri di centrifugazione, eseguita dopo il periodo di osservazione a 4 °C, per cui sarebbe fondamentale che la raccomandazione di centrifugare a 4 °C per 15 min a 1700 rpm, riportata nel

protocollo del GdS-P, fosse presente nelle istruzioni operative dell'esame in ogni laboratorio. Infine, non va dimenticato l'effetto interferente delle crioglobuline aggregate e precipitate in campioni analizzati a temperatura ambiente su molti esami ematochimici, in particolare l'emocromo, eseguito con contaglobuli impedenziometrici, sui quali le crioglobuline determinano leucocitosi e trombocitosi spurie (6).

Le sindromi crioglobulinemiche rappresentano un interessante modello di patologia indotta da particolari proteine. L'azione patogena delle crioglobuline di tipo I, secondo la classificazione di Brouet et al. (7), si può ricondurre alla iperviscosità plasmatica con occlusione dei vasi periferici, mentre i tipi II e III, o crioglobuline miste, determinano una tipica malattia da immunocomplessi, con sintomi di vasculite in vari distretti corporei. In realtà, non è ancora chiaramente dimostrato come le crioglobuline possano aggregarsi e precipitare anche negli organi viscerali, come ad esempio nel rene, che non sono mai esposti a basse temperature, a differenza della cute. A questo proposito è stato assegnato un ruolo importante alla concentrazione di ioni cloruro nella formazione degli immunocomplessi da crioglobuline a livello del glomerulo renale, che potrebbe avvenire dunque con un meccanismo indipendente dalla temperatura, nonostante questi immunocomplessi *in vitro* mostrino tutte le caratteristiche di crioglobuline di tipo II (8). Dal punto di vista clinico, quindi, la classificazione in crioglobuline monoclonali e miste appare non solo sufficiente, ma anche dirimente, per cui l'applicazione di ulteriori distinzioni, possibile con l'impiego di sofisticate tecniche separative (9, 10), sembra giustificata solo per accrescere le conoscenze biochimiche e fisiopatologiche, ma non per fornire un contributo clinico aggiuntivo. E' invece importante ricordare che la sintomatologia non è mai correlata al valore di criocrito stimato, tanto che le crioglobuline possono essere un riscontro casuale nel siero conservato a 4 °C di soggetti asintomatici.

In genere, questo esame è richiesto appropriatamente, anche se spesso non viene considerato in contesti clinici dove potrebbe invece essere utile sia alla diagnosi che all'inquadramento prognostico del paziente (4). In questo senso, il lavoro di Cesati et al. (2) riporta l'utilità della ricerca di crioglobuline nei soggetti con componente monoclonale di primo riscontro, algoritmo consigliato anche dalle linee guida del "College of American Pathologists" sul monitoraggio biochimico delle gammopatie monoclonali, perchè in grado di identificare il 13% dei pazienti a rischio di eventuali complicanze vasculitiche a livello cutaneo, renale o del sistema nervoso periferico (11).

In conclusione, la ricerca delle crioglobuline è un esame di laboratorio sempre attuale, talvolta gestito con approssimazione metodologica e a volte poco considerato clinicamente, la cui importanza è ben chiara agli specialisti di laboratorio, e non solo a livello italiano. Quasi contemporaneamente alla pubblicazione dei contributi qui commentati, è comparsa un'ulteriore esauriente rassegna, con un editoriale di accompagnamento, anche sulla rivista dei biochimici clinici britannici (12, 13). Ancora una volta, però, essa non rappresenta una presa di posizione ufficiale della corrispondente società scientifica d'oltremanica e ha quindi valenza limitata, a differenza della raccomandazione del GdS-P, che, in qualità di documento approvato dalla SIBioC, rappresenta il necessario punto di riferimento per tutti coloro che volessero adattare i propri protocolli di ricerca, quantificazione e caratterizzazione delle crioglobuline ad una metodologia raccomandata almeno su scala nazionale.

BIBLIOGRAFIA

1. Basile U, Passerini G. Ricerca, quantificazione e caratterizzazione delle crioglobuline: indicazioni per un protocollo condiviso. Biochim Clin 2010;34:218-22
2. Cesati R, Besana S, Tramacere P. Il coinvolgimento del medico curante e la ricerca delle crioglobuline nella gestione del paziente con sospetta componente monoclonale. Biochim Clin 2010;34:207-11.
3. Kallemuchikkal U, Gorevic PD. Evaluation of cryoglobulins. Arch Pathol Lab Med 1999;123:119-25.
4. Shihabi ZK. Cryoglobulins: an important but neglected clinical test. Ann Clin Lab Sci 2006;36:395-408.
5. Vermeersch P, Gijbels K, Godelieve M, et al. A critical appraisal of current practice in the detection, analysis, and reporting of cryoglobulins. Clin Chem 2008;54:39-43.
6. Dolci A, Banfi G. Riconoscimento di crioglobulinemia. Biochim Clin 1987;11:962.
7. Brouet JC, Clauvel JP, Dannon F, et al. Biological and clinical significance of cryoglobulins: a report of 86 cases. Am J Med 1974;57:775-88.
8. Di Stasio E, Bizzarri P, Casato M, et al. Cl^- regulates cryoglobulin structure: a new hypothesis for the physiopathological mechanism of temperature non-dependent cryoprecipitation. Clin Chem Lab Med 2004;42:614-20.
9. Tissot JD, Schifferli JA, Hochstrasser DF, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of cryoglobulins an identification of an IgM-associated peptide. J Immunol Meth 1994;173:63-75.
10. Pontet F, Halimi C, Brocarde A, et al. Biclonal immunoglobulin M dysglobulinaemia: evolving aspects in a case of primary Sjögren syndrome. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1997;35:287-90.
11. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, et al. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999;123:106-7.
12. Sargur R, White P, Egner W. Cryoglobulin evaluation: best practice? Ann Clin Biochem 2010;47:8-16.
13. Lock RJ. The cold hard facts of cryoglobulinemia. Ann Clin Biochem 2010;47:1.