

## Valutazione di un metodo preparativo per la tipizzazione delle crioglobuline

Gabriella Passerini, Mladen Trbos, Andrea Motta, Massimo Locatelli, Fernanda Dorigatti

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

### ABSTRACT

**Evaluation of a preparative method for cryoglobulin characterization.** We evaluated a preparative method for cryoglobulin characterization (Cryokit, Alfa Wassermann) that allows samples to be managed without dedicated methods needing time and additional resources. The Cryokit consists of two solutions: solution A for washing cryoglobulins and solution B for dissolving them. The latter is a protein solution, which irreversibly disaggregate immunocomplexes allowing both quantitative and qualitative evaluation of cryoglobulins. During a first step of the work, 27 cryoprecipitates obtained with Cryokit were characterized by immunofixation electrophoresis (IFE) using the standard serum protein method on SAS3 (Alfa Wassermann). Results were compared with those obtained through the standard preparative treatment (saline washing and dissolving) and IFE with a dedicated method at 37° C on Hydrasis system (Sebia). The ability of the new method in reducing artifacts caused by physico-chemical cryoglobulin characteristics was specifically evaluated. After this step some modifications to the standard procedure were introduced. The stability of Cryokit precipitates was tested after 7 and 10 days of storage at 4 °C performing the IFE at room temperature. Afterwards, 36 additional samples (cryocrit range, <1%-29%) were analysed with Cryokit following the modified procedure (increased washing cycles and quantification of the total protein in the precipitate). Protein quantification and electrophoresis of the dissolved cryoglobulins were helpful to optimize sample dilution before IFE. The Cryokit allowed us to perform cryoglobulin IFE on routine electrophoresis analyzers with some advantages in the laboratory organization. The procedure was reproducible and showed a clearer interpretation of immunoelectrophoretic patterns by reducing artifacts.

### INTRODUZIONE

Per definizione la crioglobulinemia è la presenza nel siero di una o più immunoglobuline (Ig) mono- (crioglobulinemia monoclonale) e/o policlonali (crioglobulinemia mista), che precipitano o gelificano in modo reversibile a temperature inferiori a 37 °C. Nel 1933, Wintrobe descrisse per la prima volta il caso di un paziente affetto da mieloma multiplo il cui siero presentava una precipitazione già a temperatura ambiente (1). Studi successivi hanno documentato la presenza di crioglobuline (CRG) nel corso di malattie infiammatorie, autoimmuni, neoplastiche e infettive a diversa eziologia, quale epifenomeno transitorio e spesso asintomatico innescato dall'iperstimolazione delle cellule B linfocitarie (2).

La "crioglobulinemia mista essenziale" fu descritta da Meltzer nel 1966 come patologia autonoma, con un tipico quadro clinico, definito sindrome crioglobulinemica, caratterizzato da porpora, astenia ed artralgie. Essa può associarsi a patologie d'organo, indotte dalla precipitazione in vivo delle CRG, quali nefropatie e neuropatie periferiche, o indipendenti dalle CRG, quali epatopatie e linfoproliferazione (3). Nel 1974, Brouet ha proposto una classificazione delle CRG, universalmente accettata per molti anni, strutturata in 3 tipi (4). Le CRG di tipo I sono monoclonali, rappresentano la conseguenza di 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 carboi-

drati delle Ig monoclonali. Nelle crioglobulinemie di tipo II e III o crioglobulinemie miste (CrM), la crioprecipitazione è invece legata ad un'interazione fra le Ig coinvolte più che a specifiche caratteristiche delle singole Ig. Le CrM sono immunocomplessi in cui solitamente l'antigene è una IgG e l'anticorpo con attività reumatoide anti-IgG una IgM mono o policlonale. Negli ultimi anni è stata ampiamente dimostrata la stretta associazione tra infezione da virus C dell'epatite (HCV), presenza di CrM e sviluppo di sindrome crioglobulinemica. Il HCV risulta coinvolto nella patogenesi della maggioranza delle CrM, impropriamente definite "essenziali", come dimostrano gli specifici antigeni virali rilevabili nel crioprecipitato. L'alterata "clearance" macrofagica degli immunocomplessi costituiti da CrM favorisce la loro deposizione nei tessuti che a sua volta innesca una reazione infiammatoria, rappresentata da una vasculite leucocitoclastica sistemica mediata dagli immunocomplessi, dimostrabili istologicamente nelle lesioni infiammatorie dei vasi di piccolo e medio calibro coinvolti (5).

Per il corretto inquadramento diagnostico e per il monitoraggio clinico dei pazienti affetti da sindrome crioglobulinemica, la ricerca e la caratterizzazione delle CRG mediante immunofissazione (IFE) rappresentano uno strumento diagnostico fondamentale. Tuttavia, a fronte di un'apparente semplicità delle procedure di laboratorio, alcune variabili preanalitiche e analitiche possono portare a risultati non sempre confrontabili tra i diversi laboratori. Inoltre, parallelamente all'affinamento delle tecniche analitiche (6,7), sono aumentate le difficoltà interpretative dei quadri immunoelettroforetici, che in

parecchi casi non sono più riconducibili alla classificazione di Brouet (8).

In questo lavoro, al fine di standardizzare la fase preparativa della tipizzazione di CRG, abbiamo valutato il reagente Cryokit (Alfa Wassermann) verificandone l'efficacia nel perseguire obiettivi sia di tipo analitico che gestionale.

## MATERIALI E METODI

### Campioni

Per lo studio sono stati utilizzati 63 sieri pervenuti al nostro laboratorio per ricerca, caratterizzazione e quantificazione delle crioglobuline, resi opportunamente anonimi. I campioni di sangue sono stati originariamente trattati secondo le indicazioni fornite dalle linee guida disponibili per la ricerca delle CRG (9) e cioè: a) prelievo di 20 mL di sangue in provette preriscaldate a 37 °C, mantenute a 37 °C in bagno termostatico fino a completa coagulazione, quindi centrifugato a 2000g per 10 min; b) separazione dei campioni immediatamente dopo la centrifugazione; c) trasferimento di almeno 10 mL di siero in un tubo graduato di Wintrobe subito posto a 4 °C per 7 giorni. Il criocrito è stato espresso come rapporto percentuale tra il volume di crioprecipitato e il volume di siero rilevati dopo centrifugazione a 2000g per 15 min a 4 °C.

### Metodo Cryokit

Il Cryokit è costituito da due soluzioni, la "Sol A" per il lavaggio e la "Sol B" per la solubilizzazione e la stabilizzazione del crioprecipitato. La "Sol B" è in grado di scindere gli immunocomplessi formati per l'attività reumatoide esercitata dalle Ig, di aumentare quindi la mobilità elettroforetica delle CRG e, parallelamente, anche la loro reattività immunologica nella fase di IFE.

*Lavaggio e solubilizzazione del crioprecipitato.* Dopo l'eliminazione del siero surnatante, le CRG erano lavate con 5 mL di "Sol A" mantenuta a 4 °C, centrifugando quindi a 2000g per 15 min a 4 °C. Erano effettuati due lavaggi delle CRG, risospesendo ogni volta il crioprecipitato per agitazione su vortex. Dopo l'ultimo lavaggio, eliminato il surnatante, le CRG erano risospese in uguale volume di soluzione fisiologica e diluite con "Sol B", ottenendone una dissoluzione irreversibile. La diluizione delle CRG era eseguita con 0,2 mL di "Sol B" per ogni unità percentuale di criocrito. In alcuni campioni con elevato criocrito (>5%) la risolubilizzazione del crioprecipitato è stata completata incubando la diluizione a 37 °C.

*IFE delle CRG.* Su analizzatore SAS3/SAS4 (Alfa Wassermann) sono state eseguite l'elettroforesi e l'IFE su gel d'agarosio dei campioni di CRG disaggregati dalla "Sol B", applicando le metodiche standardizzate e senza ulteriori diluizioni (elettroforesi, migrazione a 480V per 13 min a 18 °C; IFE, migrazione a 650V per 6,5 min a 21 °C).

### Procedura di confronto

*Lavaggio e solubilizzazione del crioprecipitato.* Dopo l'eliminazione del siero surnatante, le CRG erano lavate 3 volte con soluzione fisiologica a 4 °C, centrifugando a 2000g per 15 min a 4 °C, risospesendo ogni volta il crioprecipitato per agitazione su vortex. Dopo il terzo lavaggio, eliminato il surnatante, le CRG erano risospese in uguale volume di soluzione fisiologica e incubate a 37 °C fino a completa dissoluzione.

*IFE delle CRG.* È stata eseguita su gel d'agarosio (Hydragel) sul sistema Hydrasys (Sebia) utilizzando il programma di migrazione dedicato a 37 °C dopo applicazione dei campioni di CRG, incubati a 37 °C per 15 min e diluiti 1:8 con soluzione fisiologica preriscaldata a 37 °C. Le diluizioni sono state erogate sugli applicatori preriscaldati immediatamente prima della migrazione elettroforetica.

### Protocollo di studio

Lo studio si è svolto in due fasi. Nella prima fase sono state confrontate le IFE di 27 CRG, suddivise in due aliquote. La prima aliquota è stata preparata con il metodo in valutazione, applicando rigorosamente la procedura originale, ed analizzata in IFE. La seconda aliquota è stata gestita secondo le procedure preanalitica ed analitica in uso nel nostro laboratorio (procedura di confronto).

In questa fase abbiamo verificato: a) l'efficacia della procedura di lavaggio delle CRG con la "Sol A" in funzione anche del numero di cicli di lavaggio, selezionando campioni con elevato criocrito e risospesendo in soluzione fisiologica a 37 °C, anziché nella "Sol B", un'aliquota di questi campioni dopo il lavaggio con Cryokit per poi analizzarli in IFE a 37 °C; b) la concordanza con il metodo in uso; c) la riproducibilità delle IFE ottenute dopo preparazione del crioprecipitato con Cryokit, ripetendo l'analisi 3 volte in 9 campioni; d) la stabilità delle CRG pretrattate con Cryokit, valutando la riproducibilità delle IFE di campioni conservati a 4 °C per 7 e 10 giorni dopo il pretrattamento.

Nella seconda fase, su 36 nuovi campioni di CRG, la procedura d'utilizzo del Cryokit è stata modificata in base ai risultati della prima fase, aumentando a tre il numero dei cicli di lavaggio delle CRG e variando la modalità di dissoluzione del crioprecipitato (le CRG sono state diluite con "Sol B" in rapporto 1:5). Inoltre, per ottimizzare le diluizioni da eseguire prima della IFE, sono state misurate le concentrazioni delle proteine totali delle CRG così solubilizzate ed è stata eseguita una corsa elettroforetica preliminare a temperatura ambiente su SAS3/SAS4. La concentrazione proteica delle CRG dissolte è stata misurata con il metodo turbidimetrico al benzetonio cloruro su sistema Modular (Roche) (10,11). I valori di proteine del crioprecipitato sono stati calcolati come differenza tra la concentrazione proteica delle CRG, diluite in rapporto 1:5 con la "Sol B", e la concentrazione proteica della "Sol B" stessa.

Abbiamo infine valutato se l'introduzione del Cryokit

dedicato alla standardizzazione della fase preanalitica della IFE delle CRG potesse essere vantaggiosa in termini gestionali, permettendo di eseguire in contemporanea sia le IFE di sieri che quelle delle CRG e di eliminare l'uso di un metodo analitico specifico a 37 °C, che richiede tempo e risorse dedicate.

## RISULTATI

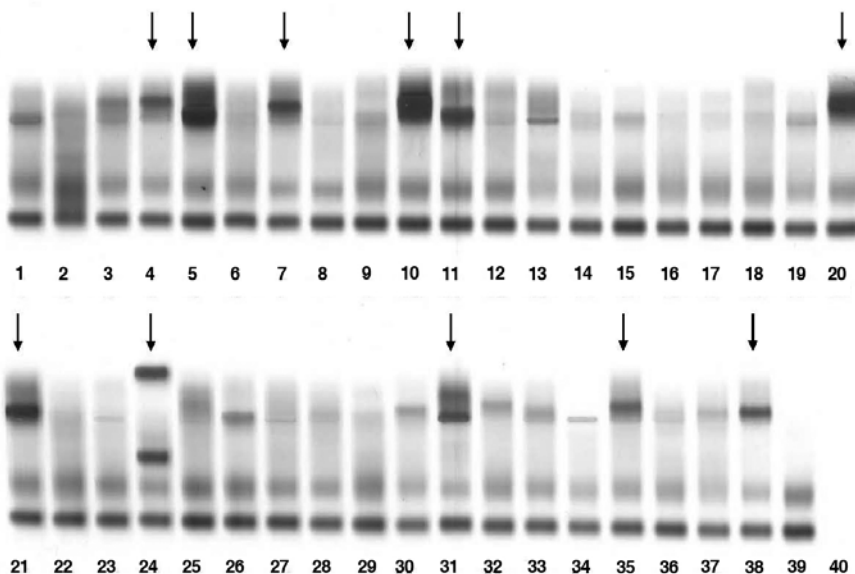
I valori di criocrito dei 63 campioni analizzati nel nostro studio erano compresi tra "tracce <1%" e 29%. I profili rilevati alla IFE risultavano inquadrabili nel 2% dei casi nel tipo I, nel 57% dei casi nel tipo II e nel 24% dei casi nel tipo III secondo Brouet. Nel 17% dei casi, invece, si osservano forme intermedie riconducibili ai tipi III/II descritti da Musset e da Tissot (6,7).

Dalla valutazione degli aspetti tecnici del pretrattamento delle CRG si rilevava che due cicli di lavaggio con "Sol A" eseguiti su campioni con criocrito >4% non garantivano la completa eliminazione dei residui di sieroproteine dal crioprecipitato. Infatti, risospesando in fisiologica a 37 °C un'aliquota di CRG lavate due volte con "Sol A" ed eseguendo la IFE a 37 °C, senza utilizzare la "Sol B" che contiene albumina bovina e una sostanza peptidomimica, nel 20% dei campioni con criocrito elevato si osservava una lieve banda di albumina nel tracciato della IFE. Un ulteriore ciclo di lavaggio con "Sol A" eliminava completamente i residui di sieroproteine dal crioprecipitato. Tre cicli di lavaggio con "Sol A" permettevano di recuperare CRG in quantità sufficiente per procedere alla fase analitica nel 80% dei campioni con criocrito <1%; per favorire il recupero dei campioni con criocrito più basso, era necessario porre le CRG, risospese in "Sol A", a 4 °C per una notte prima effettuare il successivo ciclo di lavaggio con "Sol A".

Il confronto delle IFE eseguite in parallelo nella prima fase dello studio indicava un'ottima concordanza nel 67% dei profili immunoelettroforetici valutati, che corrispondeva a 18 campioni con criocrito <5%, mentre risultava critica l'interpretazione delle IFE nel 55% dei campioni con criocrito >5%. Ripetendo l'analisi di questi crioprecipitati dopo ulteriore diluizione (1:3 con "Sol B"), si osservava una riduzione degli artefatti in zona di applicazione del campione e si ottenevano nel 80% dei casi profili immunoelettroforetici meglio interpretabili e meglio comparabili con il metodo di confronto. Le IFE ripetute dei 9 campioni trattati con il Cryokit, disponibili in quantità sufficiente, documentavano una buona riproducibilità delle analisi.

Dodici campioni con criocrito >3%, preparati con il Cryokit e conservati a 4 °C, analizzati nuovamente in IFE dopo 7 e 10 giorni, mostravano profili riproducibili, indice di stabilità delle CRG trattate.

I dati raccolti nella prima fase dello studio indicavano che dissolvendo i campioni in base al valore di criocrito (0,20 mL di "Sol B" per ogni 1% di criocrito), nel 30% circa dei casi si producevano artefatti in zona di applicazione del campione, a dimostrare che il criterio di risolubilizzazione applicato non garantiva la preparazione di campioni diluiti con contenuto proteico sufficientemente standardizzato. Solubilizzando le CRG con la "Sol B" in rapporto 1:5 e misurando le proteine totali delle diluizioni, i valori di queste potevano essere utilizzati come parametro di riferimento per la preparazione delle diluizioni prima della IFE. Le CRG con proteine >2,5 g/L sottoposte ad IFE producevano artefatti in zona di applicazione, per effetto dell'intrappolamento delle CRG nelle maglie del gel, che venivano eliminati diluendo ulteriormente il campione con "Sol B" fino ad una concentrazione proteica di circa 1,0 g/L. Analogamente una corsa



**Figura 1**

Elettroforesi su gel d'agarosio di crioglobuline solubilizzate eseguita applicando i parametri standard per le sieroproteine (SAS3 Alfa Wassermann). In posizione n° 39 si osserva il profilo elettroforetico della "Sol B" che contiene albumina bovina ed un peptide. I campioni indicati dalle frecce dovevano essere ulteriormente diluiti 1:4 con "Sol B" prima dell'immunofissazione.

elettroforetica preliminare poteva indicare quali campioni diluire ulteriormente prima della IFE (Figura 1). Nei campioni in cui si osservava un punto di applicazione troppo marcato, diluendo ulteriormente le CRG con "Sol B" prima di ripetere la IFE, si otteneva una riduzione degli artefatti e un profilo immunoelettroforetico meglio interpretabile.

## DISCUSSIONE

La sindrome crioglobulinemica per un terzo dei pazienti affetti, in cui si instaura insufficienza renale o epatica, presenta un decorso clinico estremamente severo; una diagnosi precoce e accurata e un monitoraggio attento dei pazienti può contenere la severità delle lesioni e migliorare il follow-up della malattia (12). Come già evidenziato da Kallemuchikkal e Gorevic (9) e più recentemente da Vermeersch et al. (13), la criticità delle indagini sulle CRG risiede prevalentemente nella fase preparativa delle analisi. In particolare, per la corretta tipizzazione del crioprecipitato è fondamentale eseguire in modo adeguato il lavaggio delle CRG e scindere del tutto gli immunocomplessi prima della IFE.

La sperimentazione effettuata consente nel suo complesso di dare una valutazione positiva del Cryokit in quanto idoneo a soddisfare la necessità di standardizzazione della fase preparativa di un'analisi particolarmente critica e nello stesso tempo adeguato alle esigenze organizzative del laboratorio, poiché rende possibile il consolidamento delle IFE delle CRG nella routine delle IFE sieroproteiche. Il nostro studio ha permesso di identificare le modalità di pretrattamento del crioprecipitato più adeguate per conseguire in IFE, anche disponendo di minime quantità di materiale, la più elevata sensibilità analitica e la maggior chiarezza interpretativa dei profili.

La "Sol A" del Cryokit, a pH alcalino, è formulata in modo tale da rendere instabili le CRG e favorirne il recupero durante i cicli di lavaggio; questo consente di eseguire la IFE alla maggior parte dei campioni con criocrito <1%. I nostri dati dimostrano che è indispensabile eseguire almeno tre cicli di lavaggio con "Sol A" per evitare contaminazioni di sieroproteine residue che potrebbero inficiare l'interpretazione della IFE; questa osservazione è valida in modo particolare per i campioni con elevato criocrito.

La matrice proteica della "Sol B" del Cryokit permette di lavorare a temperatura ambiente e di applicare le stesse metodiche di routine ai sieri e ai crioprecipitati solubilizzati; in particolare, permette l'esecuzione di semplici analisi preliminari (dosaggio della concentrazione proteica, tracciato elettroforetico) utili ad ottimizzare le indagini di secondo livello (IFE) che richiedono un maggior impiego di risorse. Per ottenere la completa disaggregazione degli immunocomplessi e favorire la separazione elettroforetica delle Ig e la loro reattività immunologica durante la IFE è opportuno che la quantità di CRG delle diluizioni sia <1,0 g/L. La riduzione di artefatti in zona di applicazione che si ottiene applicando questo criterio facilita l'interpretazione dei profili immunoelettroforetici.

La caratteristica peculiare del Cryokit è che la "Sol B" consente di gestire a temperatura ambiente le CRG disaggregate e di utilizzare le stesse procedure analitiche applicate ai sieri, rendendo possibile il consolidamento della tipizzazione delle CRG nella routine delle IFE sieroproteiche. Considerando che la tipizzazione di CRG è un'analisi normalmente eseguita con metodica manuale dedicata e che raramente il numero dei campioni processati nella stessa seduta analitica è tale da ottimizzare i consumi di materiale utilizzato, riteniamo che il kit possa essere vantaggioso anche in termini economici, nonostante il suo costo aggiuntivo.

## RINGRAZIAMENTI

Gli Autori ringraziano Alfa Wassermann S.p.A per avere fornito il materiale necessario per questo studio e, in particolare, Angelo Cherubini, Luciano Ferrara e Maurizio Codonesu per il loro prezioso supporto tecnico. Al Dr. Ferruccio Ceriotti si deve la revisione critica del lavoro.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Meltzer M, Franklin EC, Elias K, et al. Cryoglobulinemia: a clinical and laboratory study. II. Cryoglobulins with rheumatoid factor activity. *Am J Med* 1966;40:837-56.
3. Gorevic PD, Kassab HJ, Levo Y, et al. Mixed cryoglobulinemia: clinical aspects and long-term follow-up of 40 patients. *Am J Med* 1980;69:287-308.
4. Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, et al. Biological and clinical significance of cryoglobulins. *Am J Med* 1974;57:775-88.
5. Ferri C, Zignego AL, Pileri A. Cryoglobulins. *J Clin Pathol* 2002;55:4-13.
6. Musset L, Diemert MC, Taibi F, et al. Characterization of cryoglobulins by immunoblotting. *Clin Chem* 1992;38:798-802.
7. Tissot JD, Schifferli JA, Hochstrasser DR, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of cryoglobulins and identification of an IgM - associated peptide. *J Immunol Meth* 1994;173:63-75.
8. Bellotti V, Zorzoli I, Bossi A, et al. Immunochemical characteristics of a particular cryoglobulin. A new cryoglobulin subgroup? *Clin Exp Rheumatol* 1991;9:399-402.
9. Kallemuchikkal U, Gorevic PD. Evaluation of cryoglobulins. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:119-25.
10. Iwata J, Nishikaze O. New micro-turbidimetric method for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem* 1979;25:1317-9.
11. Luxton R, Patel P, Keir G, et al. A micro-method for measuring total protein in cerebrospinal fluid by using benzethonium chloride in microtiter plate wells. *Clin Chem* 1989;35:1731-4.
12. Ferri C, Zignego AL, Giuggioli D, et al. HCV and cryoglobulinemic vasculitis. *Cleve Clin J Med* 2002;69(suppl II):20-3.
13. Vermeersch P, Gijbels K, Mariën G. A critical appraisal of current practice in the detection, analysis, and reporting of cryoglobulins. *Clin Chem* 2008;54:39-43.