

CAT Cryoglobulinen: Indicaties en interpretatie

Auteur	Koen Gijbels
Supervisie	Dr. G. Mariën, Prof. Dr. X. Bossuyt
Search verified by	Dr. J. Frans
Datum	11 mei 2004
Vervaldatum	11 mei 2006

Klinische conclusies

1. Indicaties voor het opsporen van cryoglobulinen

- Bij klinische verschijnselen, mogelijks te wijten aan de aanwezigheid van cryoglobulinen
- Bij het opvolgen van therapie (plasmaferese), gericht op het verlagen van zeer hoge waarden
- Bij vermoeden van een “verborgen” M-proteïne
- Als screening-test lijkt deze analyse niet aangewezen, tenzij in strikt geselecteerde patiëntgroepen

2. Pre/analytische aspecten:

- werken bij 37°C
- specifiek immuunglobulinen bepalen
- identificatie en dosage: typering van de CG

3. Interpretatie:

nood aan referentiewaarden

Klinisch/Diagnostisch scenario

Cryoproteïnen zijn eiwitten uit het bloed die reversibel precipiteren bij temperaturen < 37°C. Indien dit verschijnsel optreedt in serum, bestaat het cryoprecipitaat vooral uit immuunglobulinen en spreekt men van cryoglobulinen (CG). Deze CG kunnen volgens hun samenstelling ingedeeld worden in:

Enkelvoudige (single component) CG:

Type I: één monoclonaal immuunglobuline

Gemengde CG:

Type II: (*mixed monoclonal-polyclonal CG*)

monoclonaal immuunglobuline samen met een polyclonale component

Ila: 1 monoclonale, IIb: meerdere monoclonale component(en)

Type III: (*mixed polyclonal-polyclonal CG*)

enkel polyclonale immuunglobulinen

Type I CG komen voor bij immuno/lymfoproliferatieve aandoeningen (M. Waldenström, M. Kahler, CLL,...) en gaan vooral symptomen veroorzaken door obstructie van perifere bloedvaten bij koude precipitatie. Type II en III CG komen vooral voor bij aandoeningen die een chronische B-cel stimulatie veroorzaken, zoals chronische infecties (typisch Hepatitis-C virus infectie, dit is de overgrote meerderheid van de vroegere “essentiële CG”), autoimmune/chronisch inflammatoire aandoeningen (systeemziekten, zoals Sjögren, lupus en reumatoïde arthritis) en

minder frequent lymfoproliferatieve aandoeningen (type II CG). Gemengde CG slaan intravasculair neer bij koude en induceren een vooral immuuncomplex-gemedieerde inflammatie (leucoclastische vasculitis) in de getroffen organen: palpabele purpura en ulceraties (huid), arthralgieën (gewrichten), glomerulonefritis (nier), polyneuropathie (perifere zenuwen), enz.

Het is duidelijk dat de clinicopathologische verschijnselen toegeschreven aan de aanwezigheid van cryoglobulinen in sterke mate overlappen met de symptomatologie van de onderliggende aandoeningen. Hierbij komt nog dat er een grote verscheidenheid aan technieken gebruikt wordt voor de detectie, quantificatie en typering van CG. Evenmin bestaan er eensluidende wetenschappelijk gefundeerde referentiewaarden voor CG. Dit alles maakt dat de indicatiestelling tot het opsporen van CG en de interpretatie van de bekomen laboresultaten geen éénvoudige opgave zijn.

Vraagstelling

1. Welke zijn de **indicaties** voor het opsporen (en eventueel doseren en typeren) van cryoglobulinen ?
2. Hoe wordt deze **laboratoriumtest** het best uitgevoerd?
3. Hoe worden de bekomen resultaten het best **geïnterpreteerd**?

Zoektermen

Zoektermen: cryoglobulins [MeSH], cryoglobulinemia [MeSH], cryofibrinogen, cryoprotein

Databases: Medline (PubMed), SUMSearch, National Guideline Clearinghouse, DARE, Cochrane Library, UpToDate online versie 12.1 (2004), NCCLS, American Society of Hematology, American College of Rheumatology

Relevante artikels / Referenties

RICHTLIJNEN *GUIDELINES*

1. Le Carrer D. **Cryoglobulinémies : Proposition d'un protocole d'exploration biologique. Actualisation de leur classification.** Feuille Biol 1998 ; 29: 55-65
2. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, Gorevic PD, Kyle RA, Tomar RH. **Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies.** Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 106-107
3. Kallemuchikkal U, Gorevic PD **Evaluation of cryoglobulins.** Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 119-125
4. Peng SL, Schur PH **Overview of cryoglobulins and cryoglobulinemia.** UpToDate online 12.1; 2004
5. Peng SL, Schur PH **Cryofibrinogenemia.** UpToDate online 12.1; 2004
6. Workshop T5: **Cryoproteins** in : The clinical aspects of protein assays 2003 (CAPA, The University of York) Workshop Handbook 2003

OVERZICHTSARTIKELS *REVIEWS*

7. Jennette JC, et al. **Nomenclature system of systemic vasculitides. Proposal of an International Consensus conference.** Arthr Rheum 1994; 37: 187-192
8. Dispenzieri A. **Symptomatic cryoglobulinemia.** Curr Treat Options Oncol 2000; 1: 105-118
9. Gorevic PD **Cryopathies: Cryoglobulins and cryofibrinogenemia.** in: Samter's immunologic diseases 6th Ed. Austen KF et al. Eds. 2001: 1002-1022
10. Weksler ME, Szabo P. **Aging and the immune system.** (p. 1086-1093) in: Samter's immunologic diseases 6th Ed. Austen KF et al. Eds. 2001: 1002-1022
11. Dammacco F, Sansonno D, Piccoli C, Tucci FA, Racanelli V. **The cryoglobulins : an overview.** Eur J Clin Invest 2001; 31: 628-638
12. Wigley FM. **Raynaud's phenomenon.** N Engl J Med 2002; 347 : 1001-1008
13. Ferri C, Zignego AL, Pileri SA. **Cryoglobulins.** J Clin Pathol 2002; 55 : 4-13
14. Madore F. **Plasmapheresis: Technical aspects and indications.** Crit Care Clin 2002; 18: 375-392
15. Fiorentino DF. **Cutaneous vasculitis.** J Am Acad Dermatol 2003; 48: 311-340
16. Amdo TD, Welker JA **An approach to the diagnosis and treatment of cryofibroginemia.** Am J Med 2004; 116: 332-337

ORIGINELE ARTIKELS

17. 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: 837-856
18. Cream JJ **Cryoglobulins in vasculitis.** Clin Exp Immunol 1972 ; 10 : 117-126
19. Brouet J-C, Clauvel J-P, Danon F, Klein M, Seligman M. **Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases.** Am J Med 1974; 57: 775-788
20. Gorevic PD, Kassab HJ, Levo Y, Kohn R, Meltzer M, Prose Ph, Franklin EC. **Mixed cryoglobulinemia: Clinical aspects and long-term follow-up of 40 patients.** Am J Med 1980; 69: 287-308
21. Romaszko JP, Tridon A, Jouanel P, Subtil E, Dibet P, Betail G. **Détection et analyse des cryoglobulines: étude comparative d'une population de malades et d'une population de témoins sains.** Path Biol 1993; 41: 525-529

22. Tzioufas AG, Boumba DS, Skopouli FN, Moutsopoulos HM. **Mixed monoclonal cryoglobulinemia and monoclonal rheumatoid factor cross-reactive idiotypes as predictive factors for the development of lymphoma in primary Sjögren's syndrome.** Arthr Rheum 1996; 39: 767-772
23. Ferri C, La Civita L, Zignego AL, Pasero G. **Viruses and cancers : possible role of hepatitis C virus.** Eur J Clin Invest 1997; 27: 711-718
24. Tissot JD, Invernizzi F, Schifferli JA, et al. **Two-dimensional electrophoretic analysis of cryoproteins : a report of 335 samples.** Electrophoresis 1999; 20: 606
25. Dispenzieri A, Gorevic PD. **Cryoglobulinemia.** Hematol Oncol Clin North Am 1999; 130: 226-230
26. Blain H, Cacoub P, Musset L, Costedoat-Chalumeau N, Silberstein C, Chosidow O, Godeau P, Frances C, Piette JC. **Cryofibrinogenaemia: a study of 49 patients.** Clin Exp Immunol 2000 ; 120 : 253-260
27. Kröger K, Billen T, Neuhaus G, Santosa F, Buss C, Kreuzfelder E, Henneberg-Quester KB. **Relevance of low titers of cryoglobulins and cold-agglutinins in patients with isolated Raynaud phenomenon.** Clin Hemorheol Microcirc 2001; 24: 167-174
28. Rieu V, Cohen P, André M-H, Mouthon L, Godmer P, Jarrousse B, Lhote F, Ferrière F, Dény P, Buchet P, Guillivin L. **Characteristics and outcome of 49 patients with symptomatic cryoglobulinemia.** Rheumatol 2002 ; 41 : 290-300
29. Fohlen-Walter A, Jacob C, Ledompte T, Lesesve JF. **Laboratory identification of cryoglobulinemia from automated blood cell counts, fresh blood samples, and blood films.** Am J Clin Pathol 2002; 117: 606-614
30. Kayali Z, Buckwold VE, Zimmerman B, Schmidt WN. **Hepatitis C, cryoglobulinemia, and cirrhosis: a meta-analysis.** Hepatol 2002: 36: 978-985
31. Bakker AJ, Slomp J, de Vries T, Boymans DAG, Veldhuis B, Halma K, Joosten P. **Adequate sampling in cryoglobulinaemia: recommended warmly.** Clin Chem Lab Med 2003; 41: 85-89

Evaluatie

Inleiding

Cryoglobulinen (CG) zijn eigenlijk een labo-fenomeen, waarbij we *in vitro* trachten na te bootsen wat we denken dat er *in vivo* gebeurt, namelijk het precipiteren (neerslaan) van immuunglobulinen ten gevolge van temperatuursdaling < 37°C (9, 11, 13). CG worden geacht te ontstaan wanneer er (te veel) immuunglobulinen door de B-lymfocyten geproduceerd worden met bepaalde fysicochemische eigenschappen waardoor ze gemakkelijker o.i.v. koude precipiteren. Er kan een enorme diversiteit aan immuunglobulinen geproduceerd worden, en afhankelijk van aminozuursamenstelling, post-translationele modificaties en eventuele specificiteit

voor andere immuunglobulinen, gaan sommige immuunglobulines precipitaten vormen. Omstandigheden waarin dit gebeurt zijn maligne onttaarding (lymfo- en immunoproliferatieve aandoeningen) of chronische stimulatie van B-lymfocyten, zoals voorkomt bij (auto)immuun-aandoeningen en chronische infecties. In het eerste geval zal één enkele maligne celclon één enkel immuunglobuline produceren (paraproteïne, officiële benaming “M-proteïne”) en bevat het CG 1 monoclonale component (type I CG) (klassificatie volgens Brouet, 19). Vermits IgM blijkbaar het makkelijkst precipiteert (groot pentameer molecule) is de meest frequente oorzaak van dit type CG de macroglobulinemie (M. Waldenström). Indien het CG geen monoclonale component bevat, wordt het type III genoemd. Type III CG zijn frequent bij chronische infecties aantoonbaar, laag in titer en meestal voorbijgaand van aard. Type II CG zouden in sommige gevallen de overgang kunnen vormen van de chronische polyclonale activatie van B-lymfocyten (type III), over oligoclonaliteit (type IIb), naar de monoclonale onttaarding van een enkele clon (type IIa) die dan de overhand krijgt (type I) (1, 13, 24). Klinisch is er inderdaad een verhoogde incidentie aan lymfomen na langdurige chronische autoimmuunziekten of infecties (zie lager onder d.). Bij de gemengde CG is er meestal IgM, eventueel samen met IgG en/of IgA, in het CG aanwezig. Sommige van deze IgM componenten vertonen RF-activiteit met de klassieke RF-assays. Naast immuunglobulinen kunnen soms nog andere eiwitten in het cryoprecipitaat worden aangetoond: o.a. complementfactoren, albumine, fibrinogeen, HCV. Het is niet altijd duidelijk of het hier gaat om in vitro artefacten, dan wel om componenten die ook in vivo in de CG aanwezig zijn. Fibrinogeen kan wijzen op een onvolledig gestold “serum”-staal of op de aanwezigheid van cryofibrinogeen (dit dient op een *plasmastaal* opgespoord te worden), analoog aan CG, doch de klinische betekenis hiervan is niet echt duidelijk (5, 9, 16, 26). Cryofibrinogeen wordt in ons laboratorium niet bepaald.

Fysiopathologisch veroorzaken type I (zuiver monoclonale) CG (reversible) obstructie van de kleine bloedvaten door hyperviscositeit bij temperatuursdaling. De gemengde CG (types II en III) gaan intravasulair precipiteren als immuuncomplexen en via complementactivatie een (leucoclastische) vasculitis van kleine en middelgrote bloedvaten in meerdere organen veroorzaken.

1. Indicaties

Vooreerst dient duidelijk gesteld te worden dat CG bij meerdere aandoeningen kunnen voorkomen, en dat ze bij geen enkele aandoening bij 100% van de patiënten aanwezig zijn of deel uitmaken van diagnostische criteria (op de “essential cryoglobulinemic vasculitis” na, zie lager). Verdere complicaties zijn een grote verscheidenheid van analytische procedures voor het bepalen van CG en het ontbreken van referentiewaarden (zie onder deel 2. en 3.)

Klassieke parameters zoals sensitiviteit en specificiteit kunnen voor de analyse van CG momenteel dan ook niet bepaald worden. Gorevic heeft al de mogelijke aandoeningen die gepaard kunnen gaan met CG samengevat (9, Tabel 1): meteen valt de grote verscheidenheid aan aandoeningen op, alsook de enorme variatie in incidentie in het voorkomen van CG (bvb. mononucleosis infectiosa: 29-95%, SLE: 16-89%). Wanneer kan het dan zinvol zijn om CG op te sporen en ze eventueel te doseren en verder te typen?

a. Bij verschijnselen mogelijks aan CG te wijten

Zoals hoger beschreven kan de klinische symptomatologie tgvv CG zeer variabel zijn (28, Tabel 2) en is het onderscheid tussen type I en de gemengde CG (type II en III)

zeker niet altijd op basis van de klinische verschijnselen te maken. Bij type I CG overheersen vooral vasculo-occlusieve fenomenen in de extremiteiten bij koudeblootstelling (Raynaud-fenomeen en gangreen) en is het optreden van symptomen frequenter bij hogere CG-spiegels. In een recent overzichtsartikel over Raynaud wordt bij de diagnostische aanpak aanbevolen CG enkel bij die patiënten te bepalen die ook andere symptomen van systeemziekten vertonen (12). Een andere groep vond de lage titers aan CG die bij sommige patiënten met geïsoleerd Raynaud-fenomeen worden aangetroffen diagnostisch en prognostisch irrelevant (27).

Bij de gemengde CG (type II en III) overheerst de immuuncomplex vasculitis, die zich op talrijke manieren kan uiten (Tabel 2). Slechts ongeveer 15% van de patiënten met gemengde CG vertoont symptomen en hiervan wordt slechts 10-30% door koude verergerd (13, 15). Symptomatologie is weinig tot niet aan de CG-spiegels gerelateerd. Klassiek wordt cryoglobulinemische vasculitis beschreven als “Meltzer’s triad”: palpabele purpura (onderste ledematen), arthralgieën en nefritis/asthenie (17, 28, Tabel 2). Het is duidelijk dat de clinicopathologische verschijnselen toegeschreven aan de aanwezigheid van cryoglobulinen in sterke mate overlappen met de symptomatologie van de onderliggende aandoeningen. Indien geen duidelijke oorzaak gevonden wordt, spreekt men van “essentiële cryoglobulinemie”. De Chapel Hill vasculitis classificatie vermeldt ook “essential cryoglobulinemic vasculitis” als aparte entiteit, de enige aandoening trouwens waarbij de aanwezigheid van CG strikt vereist is (7). Ondertussen is bekend dat de meeste van de essentiële cryoglobulinemies te wijten zijn aan infectie met het Hepatitis C virus (HCV, ontdekt in 1989). Cijfers in de literatuur gaan van 50 tot 90%, sommigen beweren zelfs 100% (11, 13). HCV-testen kunnen inderdaad vals-negatief zijn t.g.v.v. de aanwezigheid van CG omdat zowel anti-HCV antistoffen als HCV-RNA in het CP kunnen “gevangen” worden (9). Omgekeerd vertonen 40% - 66% van de HCV-patiënten CG. “Essentiële” cryoglobulinemische vasculitis is dan ook beter te beschouwen als clinicopathologische, dan als nosologische entiteit (13). De frequentie van de aan de CG geassocieerde aandoeningen en de gedetecteerde types CG worden in grote mate bepaald door de patiëntenpopulatie, b.v.b. de hoge prevalentie aan HCV-infectie in Zuid-Italië.

De gepubliceerde richtlijnen stellen dat men CG enkel dient op te sporen bij patiënten met klinische symptomen of labo-resultaten suggestief voor CG, die ook aan ziekten lijden waarvan gekend is dat ze met CG kunnen geassocieerd zijn (2, 3). Bij onze eigen aanvragers (Tabel 3) wordt de indicatiestelling blijkbaar in sommige omstandigheden breder geïnterpreteerd (Tabel 4). We hebben 259 opeenvolgende stalen over 4 maanden (juni-september 2003) waarop CG werden aangevraagd, geanalyseerd (Tabel 5). Met de momenteel door ons gehanteerde cutoffs bekomen wij 46% positieve stalen, waarvan 53% uit type III CG met lage titer (5-74 mg/L) bestaan. Van de patiënten bij wie uiteindelijk een systeemziekte werd gediagnosticeerd was 35/75 positief voor CG (vooral type III), voor de hematologische aandoeningen 13/30 (vooral type I), de leveraandoeningen 13/17 (allen gemengde CG), waarvan 9 HCV+, en bij slechts 15/59 van de patiënten met nierziekten werden CG aangetoond (zie ook onder d.). Het hoge percentage positieve resultaten met lage titers is waarschijnlijk te wijten aan een combinatie van brede indicatiestelling en lage cutoffs (zie ook deel 3.).

b. Opvolgen van plasmaferese-therapie wegens cryoglobulinemie

Plasmaferese wordt therapeutisch gebruikt bij zeer hoge titers van type I CG (8, 14). Het is dan ook logisch om het effect van deze therapie te volgen aan de hand van de CG-spiegels. Richtlijnen hiervoor ontbreken echter. Voor andere types van symptomatische CG (type II en III) is dit waarschijnlijk weinig nuttig vermits de symptomatologie, i.t.t. type I CG, niet gebonden is aan de CG-spiegel en therapie op de onderliggende aandoening gericht is, eerder dan op het verlagen van de CG-spiegel.

c. Bij (sterk) vermoeden van een “verborgen” M-proteïne

Indien een monoclonaal immuunglobuline zich geheel of gedeeltelijk als CG gedraagt, zal het vaak niet of onvolledig opgemerkt worden bij de routinemethodes gebruikt voor het opsporen van paraproteïnes, vermits deze van serum vertrekken dat bij kamertemperatuur (of zelfs in de koelkast) is gestold (het CG kan dan in het stolsel geprecipiteerd zijn). Het is dan ook nuttig CG te bepalen bij macroglobulinemie (Waldenström) en een onverklaarde hypogammaglobulinemie (2, 3). Andere omstandigheden zijn sommige labo-artefacten die veroorzaakt kunnen zijn door CG: zeer hoge RF-waarden zonder klinische tekens van reumatoïde arthritis, onverklaarde leukocytose en thrombocytose op automatische celltellers, hyperviscositeit, verhoogde RBC-sedimentatie, hypocomplementemie (1, 29).

d. Als screening

Indien patiënten buiten de voorgaande categorieën vallen, zijn er eigenlijk weinig indicaties om naar CG te zoeken en screening wordt in de richtlijnen dan ook afgeraden: *“Screening for cryoglobulinemia is discouraged in patients with vague, nonspecific symptoms”* (2), *“...random testing for type III cryoglobulins in particular is strongly discouraged”* (3).

In onze eigen reeks vonden wij enkel de screening bij pre-niertransplantpatiënten terug: “elke pre-niertransplantpatiënt bij wie de oorzaak van de nierinsufficiëntie niet in-huis bepaald is” (ter uitsluiting van CG als oorzaak van de nierinsufficiëntie). Uit de resultaten blijkt dat de incidentie van CG bij deze groep laag (6/23) is en dat de CG-spiegels (allen type II en III) ook aan de lage kant (4-16 mg/L) zijn. Hoe deze resultaten bij het beleid gebruikt worden is niet bekend

In een recente meta-analyse (30) kwam men tot het besluit dat de aanwezigheid van cryoglobulinen bij HCV-patiënten een prognostische indicator is voor het ontwikkelen van levercirrhose (OR: 4.87, 95% CI: 3.32-7.15). Er zijn enkele rapporten in de literatuur over het ontstaan van lymfomen bij patiënten met bepaalde aandoeningen die ook type II CG vertonen. Dit is beschreven bij HCV-patiënten (23): 6-28% na 4-10 jaar follow-up, en ook bij Sjögren (22): 6/7 na 5 jaar follow-up. De aanwezigheid van type II CG kan volgens deze auteurs dan ook gebruikt worden als predictieve factor voor het ontwikkelen van lymfomen. Hoe vaak men best screent, welke waarden gehanteerd worden en wat de gevolgen zijn van de aanwezigheid van CG voor het verder opvolgen van deze patiënten, wordt echter niet vermeld. Eén van onze eigen aanvragers gaf screening bij Sjögren-patiënten ook als indicatie op (Tabel 4).

2. Laboratoriumanalyse

Uit voorgaande is duidelijk geworden dat we door koude precipiteerbare immuunglobulinen in serum willen opsporen. Essentiële is dus van :

- a) het staal op 37°C te houden om verlies van de CG door precipitatie in de bloedklonter te vermijden tijdens de stolling.
- Verdere analyses van het bekomen cryoprecipitaat dienen op 37°C te gebeuren
- b) specifiek immuunglobulines te bepalen
- c) met serum (en niet met plasma) te werken, anders kan fibrinogeen coprecipiteren en wordt cryofibrinogeen i.p.v. CG bepaald

In de eigenlijke analyse onderscheiden we 3 stappen: 1) koude precipitatie van de CG, 2) het aantonen van de CG, 3) dosage en typering van de CG.

Er zijn enkele richtlijnen, uitgaande van ervaring en consensus, over de bepaling van CG gepubliceerd (3, 6). Een echte goudstandaard voor het bepalen van CG bestaat echter niet. In deze richtlijnen wordt gesteld dat het staal (bloed, en na stolling het serum) op 37°C dient gehouden te worden (31) en dat de daaropvolgende cryoprecipitatie bij +4°C gedurende 7 dagen dient te gebeuren. Over het feit of het cryoprecipitaat reeds voor centrifugatie zichtbaar moet zijn of niet, spreekt men zich niet duidelijk uit. Evenmin zijn er richtlijnen over centrifugatie (x g, duur) en wassen van het precipitaat. Voor de quantificatie van het cryoprecipitaat worden verschillende methodes beschreven: cryocriet (relatief volume cryoprecipitaat na centrifugatie), totaal eiwit (uiteraard gevoeliger dan cryocriet), het specifiek bepalen van de immuunglobulineconcentratie d.m.v. nefelometrie of de oppervlakte van het gamma-gebied op eiwitelektroforese. Zeker indien men niet Ig-specifieke quantificatiemethodes gebruikt, is het belangrijk om een idee over de zuiverheid van het cryoprecipitaat te krijgen, dit om te vermijden dat men (vooral bij lage "CG"-spiegels) vals-positieve resultaten bekomt. Het gebrek aan referentiewaarden wordt aangehaald, met als gevolg dat men geen cutoff-waarden voor positiviteit kan opgeven. Verdere karakterisatie van de CG kan gebeuren door immunofixatie (bepaling van de clonaliteit) of immunoblotting (clonaliteit, eventueel andere proteïnes), naast de reeds eerder beschreven specifieke dosage van de verschillende immuunglobulines, en is essentieel voor de klassificatie van de gedetecteerde CG. Er wordt geen melding gemaakt van de temperatuur waarop deze verdere karakterisatie-onderzoeken dienen te gebeuren.

De meeste laboratoria beperken zich tot hetzij visuele inspectie op de aanwezigheid van cryoprecipitaat, hetzij bepaling van het cryocriet (4).

Het protocol dat wij gebruiken, volgt grotendeels de publicatie van Le Carrer (1): zie Figuur 1. Hierbij enkele bemerkingen:

- Stalen in-huis worden warm afgenomen en warm bewaard in oventjes op 37°C op de afdeling totdat ze in thermossen naar het labo worden vervoerd. Sommige afdelingen laten het staal in hun oventje overnacht stollen en sturen het afgepipetteerde serum als gewoon staal naar het labo. Deze procedures worden bij bevraging goed gevolgd, problemen zijn er vooral met afdelingen die slechts infrequent dit staaltje opsturen. Aanvragen op bloed dat niet in thermos toekomt dienen geannuleerd te worden, van serumstalen kennen we de "voorgeschiedenis" natuurlijk niet (dit geldt ook voor extra-muros stalen).
- Vermits we momenteel geen centrifugatie op 37°C kunnen uitvoeren, laten we alle bloedstalen sedimenteren op 37°C. Hierdoor hebben we soms vrij veel rode bloedcellen in ons cryoprecipitaat, met als gevolg een neerslag op de applicatieplaats.

- Vermits onze eerste analytische stap een eiwitelektroforese is, hebben we een controle op de zuiverheid van het staal. Het applicatiepunt op het elektroforesegel wordt meegemeten bij het quantifiëren van de gammaglobulinefractie, waardoor eventueel snel uitprecipiterende CG niet gemist worden (anderzijds kunnen RBC in het staal hierdoor vals-hoge waarden veroorzaken). Elektroforese laat tevens toe van een M-piek te vermoeden en stalen te selecteren voor verdere immunofixatie ter bepaling van de clonaliteit.
- Na quantificatie van de gammaglobulinefractie wordt een (waarschijnlijk conservatieve) cutoff van 5 mg/L gehanteerd voor verdere analyse (Ig-dosage): “reflex” of “cascade-testing”.
- Verdere analyse beperkt zich tot de immuunglobulinen: afzonderlijke dosage van IgA, IgG en IgM en eventueel bepaling van de clonaliteit.
- Ig-dosage dient op 37°C te gebeuren, waarvoor we momenteel RID-platen gebruiken.
- De koude precipitatie wordt 1 x/week ingezet en duurt 1 week, eventuele Ig-dosage duurt minimum 5 dagen (indien er geen bijkomende verdunning dient ingezet): de aanvrager dient dus lang op het resultaat te wachten.
- Er wordt een historische cutoff gehanteerd (vermeld in Figuur 1), waarvan we weten (op basis van een beperkte reeks gezonde vrijwilligers) dat deze te laag ligt. We geven momenteel geen referentiewaarden op en de typering wordt niet expliciet op het rapport vermeld.
- De RIZIV-tussenkost (aan 100%) bij gecombineerd opsporen, doseren en typeren bedraagt 33.10 Euro; onze totale kostprijs (boordtabellen LAG) bedraagt 109.68 Euro.

Samenvattend kunnen we dus stellen dat we de aanbevelingen uit de literatuur goed volgen, dat we ons strikt beperken tot CG als geprecipiteerde immuunglobulinen, en dat we vermoedelijk overrapportereren.

3. Interpretatie

Er bestaan momenteel geen algemeen aanvaarde referentiewaarden voor CG, net zomin als cutoffs (al dan niet afgeleid van referentiewaarden) om te bepalen of een staal positief of negatief is. Zoals uit Tabel 6 (1, 4, 5, 18, 21, 26) blijkt, worden er verschillende referentiewaarden gebruikt, al naargelang de methode die men gebruikt om CG te quantificeren: cryocriet (minst gevoelig en relatief veel staal nodig), totaal eiwit (houdt geen rekening met zuiverheid en kan dus verschillende eiwitten meten), nergens wordt de concentratie aan immuunglobulinen gehanteerd. Er worden ook geen duidelijke criteria gebruikt om de CG te klasseren. Dit lijkt misschien eenvoudig, maar vooral IgM zal door zijn pentamere natuur vaak coprecipiteren in CG. Al de beschreven referentiewaarden zijn bepaald op relatief kleine groepen gezonde (jonge) individuen. Zoals uit onze data blijkt, is de patiëntenpopulatie waarbij CG worden aangevraagd echter veel ouder (Tabel 5, mediane leeftijd 56 jaar). Het is ook gekend dat een aantal in vitro immunologische afwijkingen (in lage concentratie) toenemen met de leeftijd en eventuele comorbiditeit (bvb. ANAs, MGUS,...), zonder van enige fysiopathologische of diagnostische betekenis te zijn (10).

Bij navraag geven onze eigen klinici aan dat ze de resultaten van de CG-bepaling in functie van de klinische verschijnselen interpreteren, dat ze vooral rekening houden

met (sterk) verhoogde waarden en dat ze graag referentiewaarden bij de resultaten zouden krijgen.

Het leek ons dan ook noodzakelijk om zelf referentiewaarden voor CG op te stellen, bepaald met onze eigen methode, en op een populatie die representatief is voor de populatie waarbij meestal CG worden aangevraagd. We voeren deze studie momenteel uit op een groep patiënten met ongeveer dezelfde leeftijdsdistributie als de “CG-aanvraagpopulatie” bij wie de arts normaal geen CG zou aanvragen en we screenen deze mensen ook voor een aantal laboparameters die kunnen wijzen op een CG-gerelateerde aandoening (o.a. HCV, paraproteïnes,...).

Bijlagen

Tabel 1: aan CG geassocieerde aandoeningen (uit ref. 9)

A. Infections 1. Viral Infectious mononucleosis (29%–95%) Cytomegalovirus postperfusion syndrome (34%) Hepatitis B Chronic infection (46%) Prodrome (77%) With polyarteritis With membranoproliferative glomerulonephritis Hepatitis A (167) Adenovirus infection Hepatitis C (see Table 77.11) Human immunodeficiency virus (93) With coexistent HCV infection (67) Hantavirus (97) 2. Bacterial Subacute bacterial endocarditis ($\pm$ nephritis) (up to 90%) Lepromatous leprosy ($\pm$ erythema nodosum) (up to 95%) Acute poststreptococcal nephritis (50%–75%) Syphilis (15%–38%) Lyme disease ($\pm$ erythema chronicum migrans) (up to 45%) After intestinal bypass with arthritis Q fever (104) 3. Fungal Coccidioidomycosis 4. Parasitic Kala-azar Toxoplasmosis Tropical splenomegaly syndrome Echinococcosis (90%) Malaria Schistosomiasis Trypanosomiasis B. Autoimmune diseases Systemic lupus erythematosus (16%–89%) Nephritis, hypocomplementemia, vasculitis (7,127,163) Drug-induced lupus (procainamide) (225) Rheumatoid arthritis (20%–40%) Extraarticular disease, Felty syndrome, synovial fluid Polyarteritis nodosa (HBsAg positive and negative) Kawasaki syndrome (159)	Sjögren syndrome (301,371) (16%) Extraglandular disease/lymphoproliferation (372) Scleroderma Sarcoidosis Thyroiditis Henoch-Schönlein purpura (47%–64%) Behçet's syndrome Polymyositis Inflammatory bowel disease (201) Celiac disease, ulcerative colitis, regional enteritis Endomyocardial fibrosis Pulmonary fibrosis (41%) Skin diseases (68) Cutaneous vasculitis Pemphigus vulgaris Erythema elevatum diutinum Cold-induced urticaria Epidermolysis bullosa acquisita Erythema multiforme POEMS syndrome (polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M protein, skin changes) Pyoderma gangrenosum C. Lymphoproliferative disorders Macroglobulinemia (primary and secondary) Lymphoma (Hodgkin and non-Hodgkin) Chronic lymphocytic leukemia Immunoblastic lymphadenopathy Hairy cell leukemia D. Renal diseases Proliferative glomerulonephritis E. Liver diseases Cirrhosis (Laennec, postnecrotic) Biliary cirrhosis (up to 90%) Chronic hepatitis F. Familial (symptomatic, asymptomatic) G. "Essential" H. Experimental Pneumococcal vaccines Streptococcal (A and C) hyperimmunization NSB/NZW, MRL/l pr, BXSB mice (spontaneous) Transplanted IgG3 hybridomas in mice (172) Injection of human type II cryoglobulins into mice (121)
---	--

HCV, hepatitis C virus; Ig, immunoglobulin; HbsAg, hepatitis B surface antigen.

Tabel 2: klinische verschijnselen bij CG (uit ref. 28)

TABLE 6. Comparison of the clinical manifestations of patients with cryoglobulinaemia in four series reported in the literature and this study. Results are expressed as percentages unless indicated otherwise

Parameter	Meltzer <i>et al.</i> 1966 [34]	Brouet <i>et al.</i> 1974 [3]	Gorevic <i>et al.</i> 1980 [28]	Cacoub <i>et al.</i> 1994 [31]	This study 2001
<i>n</i>	10	86	40	63	49
Mean age (yr)	48.9	NR	49.6	45.5	60
Sex (F/M)	9/1	NR	25/15	32/31	31/18
Types of cryoglobulin	Mixed	All	Mixed	Mixed	All
Purpura	100	55	100	34	67.3
Leg ulcers	30	5	30	NR	40.8
Raynaud's phenomenon	10	50	25	NR	34.7
Arthralgias	100	35	72.5	17	51
Renal involvement	40	21	55	NR	24.5
Hypertension	20	NR	45	11	NR
Peripheral neuropathy	10	15	20	41	55.1
Myocardial involvement	20	0	30	NR	8.2
GI involvement	20	2	20	NR	12.2
Liver disease	90	0	70	52 (HCV ⁺)	67.3 (HCV ⁺)
Sjögren's/sicca syndrome	20	7	15	NR	34.7
CNS involvement	20	2	NR	NR	6.1
Lymph nodes	60	0	17.5	NR	NR

NR, not reported.

Tabel 3: aanvragers UZ Leuven (periode jun-sep 2003)

• Nefrologie	77	
• IZ Algemene	55	
• Rheumatologie	33	
• Hematologie	24	
• Allergie & Immun	17	
• Neurologie	15	
• Hepatologie	11	
• Infectieziekten	8	
• Pneumologie	5	
• Dermatologie	4	
• Andere	10	
<i>Totaal</i>	<i>259 stalen</i>	<i>(waarvan 32 extra-muros)</i>

Tabel 4: indicaties (bij navraag) volgens aanvragers UZ Leuven

- Raynaud
- koude-gerelateerde vasculaire problemen
- Sjögren
- discrepantie sedimentatie (laag) en CRP (verhoogd)
- verlaagd complement
- (leukoclastische)(cutane) vasculitis
- (koude) urticaria
- HCV
- iedere glomerulonefritis / onverklaarde nierinsufficiëntie
- elk pre-NierTx-bilan waarbij oorzaak NI niet met zekerheid gekend (dwz meestal)

Tabel 5: resultaten CG UZ Leuven jun-sep 2003

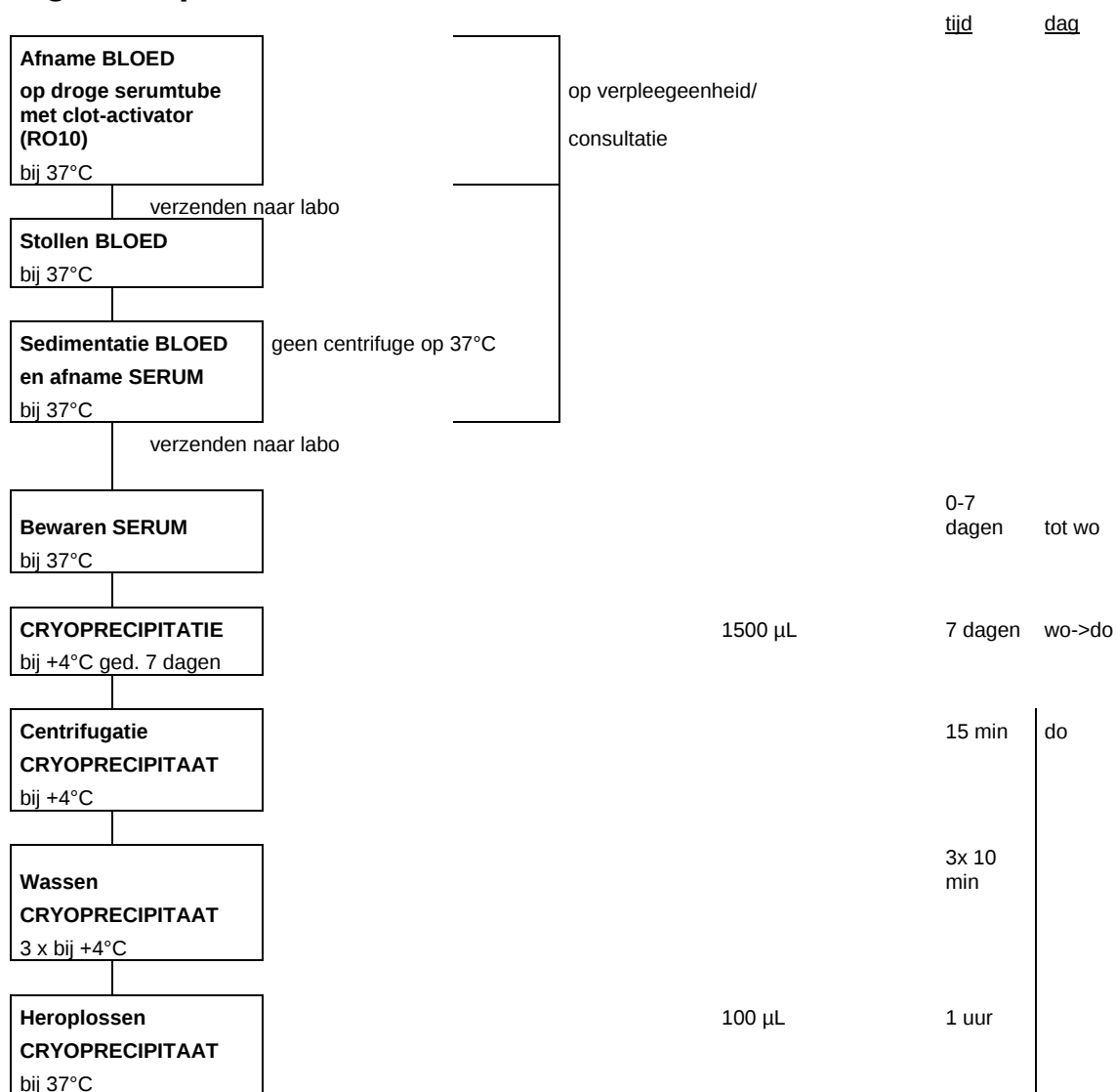
Volgens klasse (Brouet)		NEGATIEF	POSITIEF:				TOTAAL
			KL I	KI IIa	KL IIb	KI III	Tot. Pos.
n		141	15	21	19	63	118
% totaal		54,4	5,8	8,1	7,3	24,3	46
Leeftijd	med	57	60	67	58	51	56
(jaar)	P2,5-P97,5	22-83	33-80	33-85	40-79	25-85	26-83
Geslacht	M/V	56/85	5/10	9/12	6/13	22/41	42/76
	% M/V	40/60	33/66	43/57	32/68	35/65	36/64
Gammaglob	med	4	11	26	15	12	
(mg/L)	P2,5-P97,5	1-7	4-336	9-282	8-125	5-74	
					2?		
IgA	med	0	0	2	0	0	
(mg/L)	P2,5-P97,5	0-0	0-13	0-16	0-37	0-9	
	<i>monoclon</i>	0	0	0	3?	0	
IgG	med	0	5	23	9	9	
(mg/L)	P2,5-P97,5	0-7	0-2311	8-441	0-162	0-46	
	<i>monoclon</i>	2K	3K, 1L	7K	2K, 3L, 8?	0	
IgM	med	0	14	23	26	11	
(mg/L)	P2,5-P97,5	0-8	1-4068	7-592	11-123	0-152	
	<i>monoclon</i>	1K, 2L	4K, 7L	10K, 2L, 2?	8K, 3L, 9?	0	
Diagnose	SYS	40	1	8	6	20	35
	HEM	17	7	1	1	4	13
	HEP	4	0	4	2	7	13
	<i>waarvan</i>	3 HCV	0 HCV	3 HCV	2 HCV	4 HCV	9 HCV
	REN	44	2	2	3	8	15
	ESS	1	3	3	4	1	11
	REST	25	1	2	3	14	20
	??	10	1	1	0	9	11
							118
							259
<u>REST:</u>	ALL	7				4	
	AND	1	1 psy		1 ort	1 orl 3	
	INF	6				2	
	NEU	10		2	2	1	
	ONC	1				3	

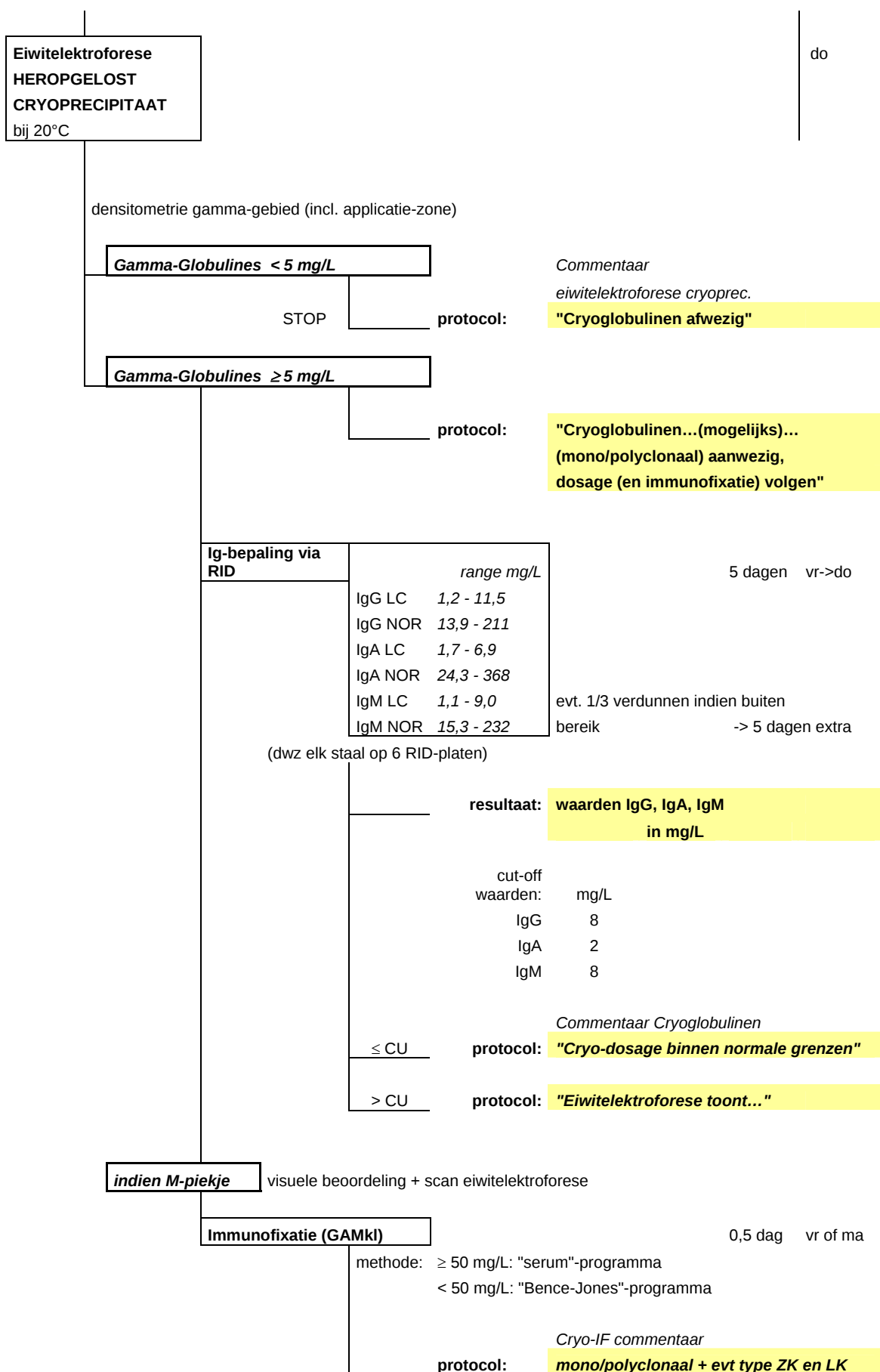
Klasse:

- 0** Geen cryoglobulines aanwezig: dosage IgA < 2 én IgG ≤ 8 én IgM ≤ 8 mg/L (ongeacht IF !)
- 1** 1 enkel Ig verhoogd bij dosage én monoclonaal op IF
- 2a** 2 of 3 Ig verhoogd bij dosage en slechts 1 monoclonale fractie (hoeft niet IgM te zijn !)
- 2b** 2 of 3 (ook 1) Ig verhoogd bij dosage en > 1 monoclonale fractie
- 3** 2 of 3 (ook 1) Ig verhoogd bij dosage en geen monoclonale fractie(s)

Tabel 6: referentiewaarden uit de literatuur

Author	Year	Reference population	Method		CU Value	Remarks	Patients
			Quantific.	Charact.			
Cream J.J. (UK)	1972	47 normal subjects	serum, 7d +4°C, CP: TE (Lowry) uit 50 mL bloed !	IEF	> 80 mg/L (log 2SD range)	detectable Ig: 13 neg; 33 pos	
Mola E.M. (UK)	1983	17 normal subjects (18 - 62 y)	serum, 7d +4°C, CP: TE (Lowry)	DID (IgA, G, M); RID IgG dos	charact > 10 mg/mL	x=6,98 mg/L (3-20) 9xno Ig (DID); 5xIgG 0,5-1,6 mg/L (RID)	visible cryprecip > 40 mg/L
Romaszko J.P. (FR)	1993	76 healthy blood donors	serum, 7d +4°C, CP: TE (Lowry)	Western Blot		x=6,5 mg/L Vis. CP: 41% +	
Le Carrer D. (FR)	1998	METHODE	serum, 7d +4°C, CP: EEf & TE (biuret)	IF	> 50 mg/L (charact > 10 mg/L)		
Blain H. (FR)	2000	72 healthy blood donors	CG: serum, 8d +4°C, CP: Abs 280nm vs GG Std	Western Blot	> 50 mg/L	2 refs det: 10 & 30mg/L (PCI A, G, M; Ocl M)	220 pats w/ symptoms ~cryoprotein: 4,5% CG, 16,8% CF (x=1610 mg/L), 10,5% CG+CF (x=820 mg/L; Ig>Fibrg)
			CF: <i>citr-plasma</i> , 8d +4°C, CP: Abs 280nm vs Fibrg Std	Western Blot	> 50 mg/L	5 refs det: x= 23 mg/L (3xPCI A, G, M; 2xPCI M)	
UpToDate	2003	PRACT GUIDELINE		CG & CF	> 50 mg/L	2-9% norm det (but <CU)	335 samples + for cryoprotein: 1 CF (0,3%) , remainder CG

Figuur 1: procedure CG detectie en karakterisatie



Te doen / Acties

- 1) Referentiewaarden opstellen voor CG
- 2) Vereenvoudiging van de laboprocedure voor het bepalen van de CG (vooral adhv de nieuwe referentiewaarden en vervangen van een aantal RID-bepalingen door turbidimetrie): minder cascade-testen (kostprijs) en sneller antwoord
- 3) Mogelijkheid onderzoeken van warme centrifugatie voor de afscheiding van het serum