



Revista Clínica Española

www.elsevier.es/rce



REVISIÓN

Guía de laboratorio para el diagnóstico de pacientes con síndrome crioglobulinémico



A. Mariscal-Rodríguez^{a,*}, L.M. Villar Guimerans^b, M. López-Trascasa^c,
M. Hernández González^d y E. Moga Naranjo^a,
en nombre del grupo de inmunoquímica de la Sociedad Española de Inmunología¹

^a Servicio de Inmunología, Hospital de la Santa Creu i, Sant Pau, Barcelona, España

^b Servicio de Inmunología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España

^c Unidad de Inmunología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

^d Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

Recibido el 15 de octubre de 2018; aceptado el 25 de octubre de 2018

Disponible en Internet el 19 de diciembre de 2018

PALABRAS CLAVE

Síndromes
crioglobulinémicos;
Vasculitis;
Crioglobulinas

KEYWORDS

Cryoglobulinaemic
syndromes;
Vasculitis;
Cryoglobulins

Resumen Los síndromes crioglobulinémicos comprenden un conjunto de manifestaciones que se encuentran en diversas enfermedades y que comparten un mismo mecanismo fisiopatológico: el depósito de crioglobulinas en lechos vasculares. La presencia de crioglobulinas es criterio diagnóstico de estos síndromes por lo que es imprescindible su correcta detección y caracterización. El Grupo de Inmunoquímica de la Sociedad Española de Inmunología ha realizado una revisión exhaustiva clínica y metodológica, debido a la heterogeneidad técnica interlaboratorios, con el objetivo de proporcionar una herramienta útil y efectiva para el diagnóstico de síndromes crioglobulinémicos.

© 2018 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). Todos los derechos reservados.

Laboratory guidelines for the diagnosis of patients with cryoglobulinaemic syndrome

Abstract Cryoglobulinaemic syndromes include a collection of manifestations that are found in various diseases and that share a pathophysiological mechanism: cryoglobulin deposit in vascular beds. For these syndromes, the presence of cryoglobulins is a diagnostic criterion, and their correct detection and characterisation are therefore essential. The Immunochemistry Group of the Spanish Society of Immunology conducted a comprehensive clinical and methodological

* Autora para correspondencia.

Correo electrónico: a.mariscal.rod@gmail.com (A. Mariscal-Rodríguez).

¹ Los nombres de los componentes del Grupo de inmunoquímica de la Sociedad Española de Inmunología están relacionados en el anexo.

review, due to the interlaboratory heterogeneity in techniques, with the objective of providing a useful and effective tool for diagnosing cryoglobulinaemic syndromes.

© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). All rights reserved.

Introducción

Los síndromes crioglobulinémicos, también conocidos como vasculitis crioglobulinémicas, son trastornos asociados a procesos malignos, infecciones crónicas^{1,2} y/o enfermedades autoinmunes³. En este tipo de patologías existe una síntesis exacerbada de inmunoglobulinas que, en ocasiones, puede dar lugar a un subgrupo de inmunoglobulinas anómalas denominadas crioglobulinas.

Las crioglobulinas son inmunoglobulinas que precipitan de manera reversible a temperaturas inferiores a 37 °C, proceso denominado crioprecipitación. Se observaron por primera vez en 1933 en un paciente con fenómeno de Raynaud⁴. Más tarde, en 1947 estas proteínas fueron caracterizadas como gammaglobulinas y englobadas bajo el término de crioglobulinas⁵.

La mera presencia de crioglobulinas en sangre define el término crioglobulinemia, mientras que la coexistencia de síntomas relacionados con las crioglobulinas es lo que define el síndrome o vasculitis crioglobulinémica⁶.

Las crioglobulinemias son patologías relativamente poco frecuentes, con una prevalencia de 1:100.000 personas, afectando más al sexo femenino que al masculino (ratio 3:1) y principalmente a un rango de edad de 42-52 años^{7,8}. Afecta de forma más frecuente a la población del sur de Europa que a la del norte de Europa o de América⁹. La prevalencia se encuentra estrechamente asociada a la enfermedad subyacente, encontrándose un 16% de pacientes con crioglobulinas entre los afectados de síndrome de Sjögren¹⁰, un 17% en VIH¹¹, un 25% en lupus eritematoso sistémico¹² y hasta un 60% en VHC^{8,13}. Un pequeño porcentaje de crioglobulinemias no se encuentra asociado a enfermedad, y son referidas como crioglobulinemias esenciales^{9,14}.

En función de la enfermedad subyacente y del tipo de inmunoglobulina se han descrito 3 tipos de crioglobulinas⁹ (tabla 1).

Crioglobulinas de tipo I

Son componentes monoclonales de tipo IgM, con menor frecuencia IgG y rara vez de tipo IgA o cadenas ligeras libres. Son las crioglobulinas que se encuentran con una menor frecuencia (10-15%)¹⁵ y se asocian a patología hematológica, principalmente a gammopatías monoclonales de significado incierto (40%) y otras alteraciones del linaje de células B, como el mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström o leucemia linfocítica crónica^{16,17}. Por lo general son crioglobulinemias asintomáticas, pero en algunos casos la precipitación de crioglobulinas en pequeños vasos puede

generar oclusiones vasculares y, subsecuentemente, cursar con síndrome de hiperviscosidad inducido por frío^{6,8,18}. Estas vasculitis de pequeño vaso afectan principalmente al riñón y la piel. La afectación renal, que se presenta principalmente en forma de glomerulonefritis, implica proteinuria, hematuria microscópica, creatinina elevada y/o hipertensión y es más común en las crioglobulinemias de clase IgG. Las manifestaciones en la piel incluyen púrpura, livedo reticularis, fenómeno de Raynaud, acrocianosis, necrosis o úlceras y suelen limitarse a extremidades distales (dedos, orejas, nariz) y tras exposición al frío. De forma menos frecuente puede observarse neuropatía periférica y/o artralgia^{16,19}.

Crioglobulinas de tipo II y III (mixtas)

Las crioglobulinas de tipo II están constituidas por IgG policlona y un componente monoclonal, habitualmente IgM, que presenta actividad de factor reumatoide (FR). Son las que se detectan con una mayor frecuencia (50-60% de pacientes crioglobulinémicos). Las crioglobulinas de tipo III se componen de IgG e IgM policlonaes, las segundas con actividad de FR. Se encuentran a una frecuencia intermedia a las de tipo I y II (25-30%)¹⁵. Con la llegada de tecnología más sensible, como el inmunoblot o la electroforesis en gel de poliácridamida en 2 dimensiones, se ha detectado un porcentaje de crioglobulinas de tipo II que muestra una composición de IgM oligoclonal o mezcla de oligo- y policlonaal. Este subgrupo podría tratarse de un estado de transición de crioglobulinemia de tipo III a tipo II y se han denominado crioglobulinas de tipo II-III^{14,20}.

Las crioglobulinas mixtas se asocian a infecciones crónicas (principalmente las de tipo II) y enfermedades autoinmunes (en su mayoría de tipo III), procesos que conllevan una hiperestimulación del sistema inmune en general y de la síntesis de anticuerpos en particular. La asociación más alta se encuentra entre las crioglobulinas de tipo II y la infección por VHC (hasta un 95%)⁸.

Las crioglobulinemias mixtas normalmente cursan con síntomas de vasculitis debido a la deposición en pequeños y medianos vasos de inmunocomplejos formados principalmente por inmunoglobulinas, antígeno y complemento, pero también por factores hemáticos locales. Por tanto, dadas sus características clínicas e histológicas, las crioglobulinemias mixtas se clasifican también dentro de las vasculitis sistémicas de pequeño vaso^{9,21}. En comparación con las crioglobulinemias de tipo I, las mixtas se presentan con síntomas constitucionales como fiebre, debilidad, mialgia/artralgia y anorexia, reflejo del desorden por inmunocomplejos¹⁷. El signo más común es la púrpura de manera aislada, en casi

Tabla 1 Clasificación y características de las diferentes crioglobulinas

Crioglobulina	Composición	Frecuencia	Patología asociada	Volumen	Tiempo de precipitado
Tipo I	IgM, IgG, IgA o cadenas ligeras libres monoclonal	10-15%	Enfermedades linfoproliferativas (GMSI, MM, MW, LLC, LNH)	30-80% del suero	Minutos-horas
Tipo II	IgM monoclonal + IgG policlonal	50-60%	Infecciones virales (VHC, VHB, VIH, VEB, CMV), bacterianas y de parásitos, desórdenes AI y linfoproliferativos	1,5-30% del suero	Horas-días
Tipo III	IgM e IgG policlonal	25-30%		0,5-1,5% del suero	3-5 días

AI: autoinmune; CMV: citomegalovirus; GMSI: gammapatía monoclonal de significado incierto; LLC: leucemia linfocítica crónica; LNH: linfoma no Hodgkin; MM: mieloma múltiple; MW: macroglobulinemia de Waldenström; VEB: virus de Epstein-Barr; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

el 90% de los pacientes; sin embargo, en un tercio de estos pacientes va acompañada de artralgia y debilidad (tríada de Meltzer)²². La enfermedad renal y la neuropatía son similares a las que acontecen en las crioglobulinemias de tipo I, aunque en estas últimas es más probable demostrar la oclusión de pequeños vasos por los agregados de crioglobulinas. Por lo general, la afectación de otros órganos además del riñón es rara, pero cuando se da es un signo que señala casi exclusivamente a una crioglobulinemia mixta¹⁷.

La sintomatología es comparable entre síndromes por crioglobulinas de tipo II o tipo III⁹, pero varía enormemente entre pacientes, desde la presencia asintomática de crioglobulinas en suero al síndrome crioglobulinémico completo.

Crioprecipitación

El proceso de crioprecipitación no se entiende por completo, pero se sabe que difiere entre las crioglobulinas de tipo I y las mixtas. En las primeras el componente monoclonal cristaliza y se agrega, proceso que depende de la temperatura y la concentración. De hecho, cuando la concentración es muy elevada, cierta precipitación puede ocurrir a temperatura ambiente y en pocas horas¹⁷. En las crioglobulinemias mixtas, sin embargo, la crioprecipitación ocurre en el contexto de la formación de inmunocomplejos entre las IgG e IgM y la fijación de complemento y se ve afectada por la avidéz de la IgG por el antígeno^{23,24}. En este tipo de crioglobulinemias los componentes IgG o IgM no precipitan de manera aislada, sino de forma conjunta, y se requieren periodos prolongados a baja temperatura para que ocurra dicha precipitación²⁵.

diagnóstico de crioglobulinemias

La correcta clasificación de los pacientes es importante en la práctica clínica, así como para los estudios epidemiológicos. Para llegar al diagnóstico de enfermedad o vasculitis crioglobulinémica son necesarios la presencia de crioglobulinas en suero y el cumplimiento de una serie de criterios clínicos y de laboratorio^{21,26,27}. En 2011 se estableció la metodología

de clasificación de los síndromes crioglobulinémicos, basada fundamentalmente en la presencia de crioglobulinas en suero como criterio de inclusión^{18,28} (fig. 1). Por tanto, es fundamental que también la detección de crioglobulinas en el laboratorio sea un procedimiento estandarizado entre centros, de manera que se obtengan resultados comparables. Se han descrito pacientes con síndrome crioglobulinémico mixto sin crioglobulinas en suero. Esto es generalmente un fenómeno transitorio debido a la amplia variabilidad en porcentaje de crioprecipitado en suero y quizás a la sensibilidad de la técnica de laboratorio empleada. En estos pacientes es necesaria la determinación reiterada de crioglobulinas para un diagnóstico correcto²⁷.

Caracterización de crioglobulinas

La caracterización de crioglobulinas en suero está limitada por la necesidad de condiciones preanalíticas estrictas, la lectura subjetiva de resultados y la falta de criterios estandarizados.

La mera detección de crioglobulinas (positiva/negativa) permite incluir o excluir a un paciente en el diagnóstico de síndrome crioglobulinémico. Por otro lado, la principal utilidad de clasificar las crioglobulinas (tipo de inmunoglobulina y monoclonalidad) es que permite diferenciar una crioglobulinemia debida a un desorden maligno de las que se deben a estimulación del sistema inmune²⁹. Además, la cuantificación de crioglobulinas es de utilidad en la toma de decisiones terapéuticas, así como en la monitorización del tratamiento de elección³⁰. En las crioglobulinemias de tipo I, que se asocian a desórdenes linfoproliferativos, el tipo de crioglobulina tiene mayor relevancia en la patogénesis de la enfermedad subyacente que la carga de crioglobulinas^{17,19}.

La caracterización de crioglobulinas se realiza en muestras de suero y el procedimiento de laboratorio se puede dividir en 3 fases:

1. Fase preanalítica.
2. Fase de detección.

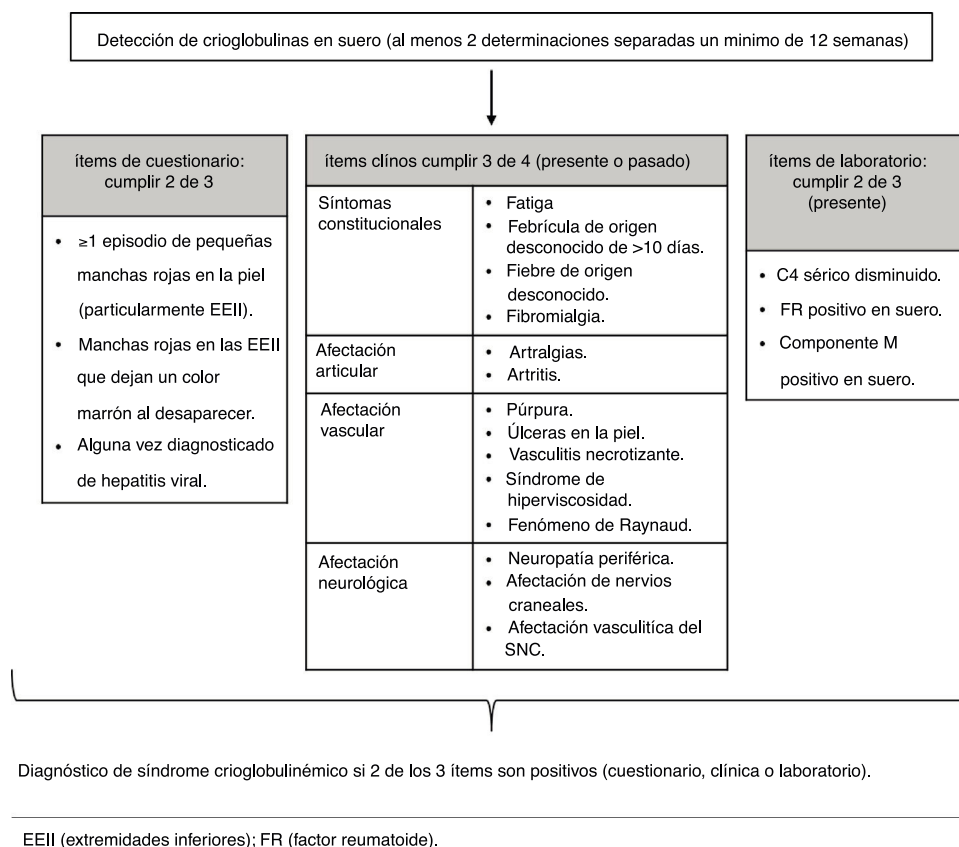


Figura 1 Criterios de clasificación preliminares para los síndromes crioglobulinémicos (adaptada de De Vita et al., 2011²⁸).

3. Fase analítica.

Fase preanalítica

En esta fase es fundamental impedir que la temperatura caiga por debajo de 37 °C durante periodos prolongados, con el fin de evitar la crioprecipitación⁴.

Se recomienda la extracción de al menos 10 mL de sangre venosa sin anticoagulante (ya sea en tubos con o sin gel), con el fin de evitar falsos positivos debidos al criofibrinógeno o a proteínas que precipitan en presencia de heparina²⁷. El volumen de muestra no debe ser inferior a 10 mL, ya que la presencia de trazas de crioglobulinas es clínicamente relevante^{18,25} y en un volumen pequeño estas trazas pueden no ser detectadas. Para dicha extracción hay protocolos que recomiendan atemperar todo el material (agujas, jeringas y tubos)^{6,25,27,31}.

Una vez obtenida la muestra de sangre, esta debe transportarse al laboratorio en termos de agua o arena o en otro contenedor^{32,33} que garantice que la temperatura permanezca en torno a los 37 °C³⁴. Posteriormente, una vez en el laboratorio y antes de la separación del suero, la muestra ha de incubarse al menos una hora a 37 °C con el fin de que se disuelvan las crioglobulinas que hayan podido precipitar^{31,35,36}.

Pasada la hora de incubación se separa el suero por centrifugación. Varios protocolos recomiendan que la centrifugación se realice a 37 °C^{31,32,36,37} o, en caso de que el laboratorio no disponga de centrifugadoras

termorregulables, se centrifugue a temperatura ambiente^{35,38,39} o se deje la muestra a 37 °C y se recoja el sobrenadante sin haber centrifugado³¹. Una vez separado el suero es recomendable añadir azida sódica a 0,1 g/L⁴⁰ para su conservación y se divide, según el procedimiento analítico a seguir: si la cuantificación se realiza en base al criocrito se recogerá la mayor parte del suero en un tubo de sedimentación o tubo de hematocrito y se alícuotará un tubo adicional (tubo 2); si el método cuantitativo de elección es la concentración de proteínas totales o de inmunoglobulinas, se realizarán 2 alícuotas (tubo 1 y tubo 2). Todos los tubos se incubarán a 4 °C entre 5 y 7 días.

Fase de detección

En esta fase, la práctica más habitual es realizar un cribado visual para descartar aquellas muestras en las que no se forma un precipitado visible tras la incubación a 4 °C^{25,27,31,32}. Este precipitado presenta por lo general un aspecto blanquecino, pero excepcionalmente es de aspecto gelatinoso o transparente, lo cual dificulta su visualización y puede catalogarse la muestra como negativa. Es por ello por lo que el personal técnico encargado de realizar la caracterización de crioglobulinas debe estar formado. Finalizada dicha incubación, utilizar el tubo 2 de las muestras con precipitado visible para comprobar que el precipitado desaparece al incubarlo a 37 °C. Es una práctica común catalogar de negativas las muestras en las que no desaparece el precipitado a esta temperatura. Sin embargo,

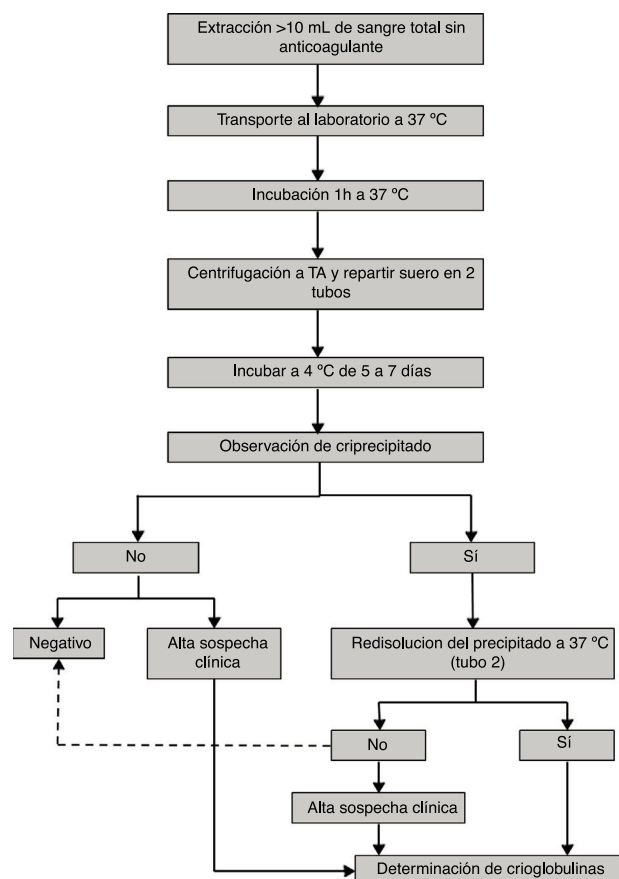


Figura 2 Algoritmo recomendado para el estudio de crioglobulinas. TA: temperatura ambiente.

hay crioglobulinas que tienen dificultad para disolverse, sobre todo aquellas que arrastran grandes cantidades de complemento y otras proteínas por lo que, para no clasificar una crioglobulina erróneamente como negativa, se debe incubar la muestra un tiempo mínimo de 1 h a 37 °C. En este punto, las muestras que se redisuelvan se someterán a la fase de tipificación (fig. 2).

Fase analítica

El protocolo de laboratorio recomendado para someter las muestras a la fase analítica se detalla en la tabla 2.

Se aceptan 3 métodos de cuantificación: porcentaje que ocupa el crioprecipitado con respecto al volumen total del suero (criocrito), concentración de proteínas totales y concentración de inmunoglobulinas. Se ha propuesto también un «test rápido» de laboratorio, que consiste en medir por turbidimetría a 10 °C y de manera continua hasta que ocurre la crioprecipitación. Este test se realizaría de forma complementaria a los test clásicos cuando el objetivo es la caracterización de crioglobulinas (pacientes para una primera determinación) o de forma exclusiva para el seguimiento de la enfermedad y el control de la eficacia de la plasmaféresis⁴¹.

De los métodos más extendidos, el criocrito, así como las proteínas totales, contienen la fracción inmunoglobulínica y otros factores relevantes que coprecipitan (como

Tabla 2 Protocolo de laboratorio recomendado para el procesamiento de muestras de crioglobulinas

Tubo de criocrito: centrifugar 1.000 xg durante 10 min a 4 °C y realizar la lectura del porcentaje que ocupa el crioprecipitado con respecto al total del volumen del suero

Tubo 1 (5-7 días a 4 °C)

Centrifugar a 2.000 xg 10 min a 4 °C

Separar el sobrenadante

Añadir 1,5 mL de PBS frío al precipitado.

Agitar con vórtex durante unos 30 segundos o hasta que no haya precipitado visible.

Centrifugar y repetir el proceso de lavado 2 veces más.

Resuspender el crioprecipitado en PBS

Incubar las muestras durante 1 h a 37 °C antes de someterlas al método cuantitativo de elección

Tubo 2 (1 h a 37 °C): seguir mismo procedimiento que para el tubo 1 centrifugando a 37 °C (o TA) y realizando los lavados con PBS a 37 °C

TA: temperatura ambiente.

el complemento); sin embargo, también pueden contener proteínas contaminantes no deseadas, como la albúmina¹⁸. Estas contaminaciones pueden reducirse lavando el crioprecipitado. No obstante, en cada lavado puede perderse hasta un tercio del crioprecipitado, hecho relevante sobre todo en crioglobulinas que se encuentran a baja concentración. La determinación del criocrito es un método con buena sensibilidad, rápido y de bajo costo, pero requiere un gran volumen de muestra y tiene peor reproducibilidad que la cuantificación de proteínas totales. Además, no es útil para comparar índice de enfermedad entre pacientes y no está estandarizado en cuanto al volumen¹⁵. La cuantificación de proteínas totales es un método con mejor reproducibilidad y más exactitud que el criocrito, dada la automatización de la técnica y la cuantificación objetiva del resultado^{29,35}. Además, permite minimizar la interferencia de proteínas que coprecipitan con las crioglobulinas si se calcula la diferencia entre la concentración del tubo a 4 °C (tubo 1) y del tubo a 37 °C (tubo 2), es decir, emplear el tubo 2 como blanco de la técnica.

En lo referente a los rangos de normalidad, no están estandarizados para la concentración total de proteínas, aunque algunos autores lo han establecido en 20-80 mg/L^{29,35}. Para los valores de inmunoglobulinas hay un solo estudio que los establece, resultando en que el 23% de 214 pacientes con crioglobulinemia superan este límite de normalidad⁴². Por tanto, debido a la actual carencia de estudios, es recomendable que cada laboratorio establezca el límite de normalidad testando una población de referencia de sujetos sin crioglobulinemia.

Tras el análisis cuantitativo, las muestras que resulten positivas (o negativas pero con alta sospecha clínica) deberán caracterizarse para completar el estudio. Las crioglobulinas pueden caracterizarse por métodos electroforéticos (ya sea en gel o capilar) o no electroforéticos (immunoblot³⁵, nefelometría de láser⁴³, inmunodifusión^{37,44} o métodos de dispersión de luz⁴⁵). Ya que el objeto de esta revisión es recomendar un protocolo para la estandarización

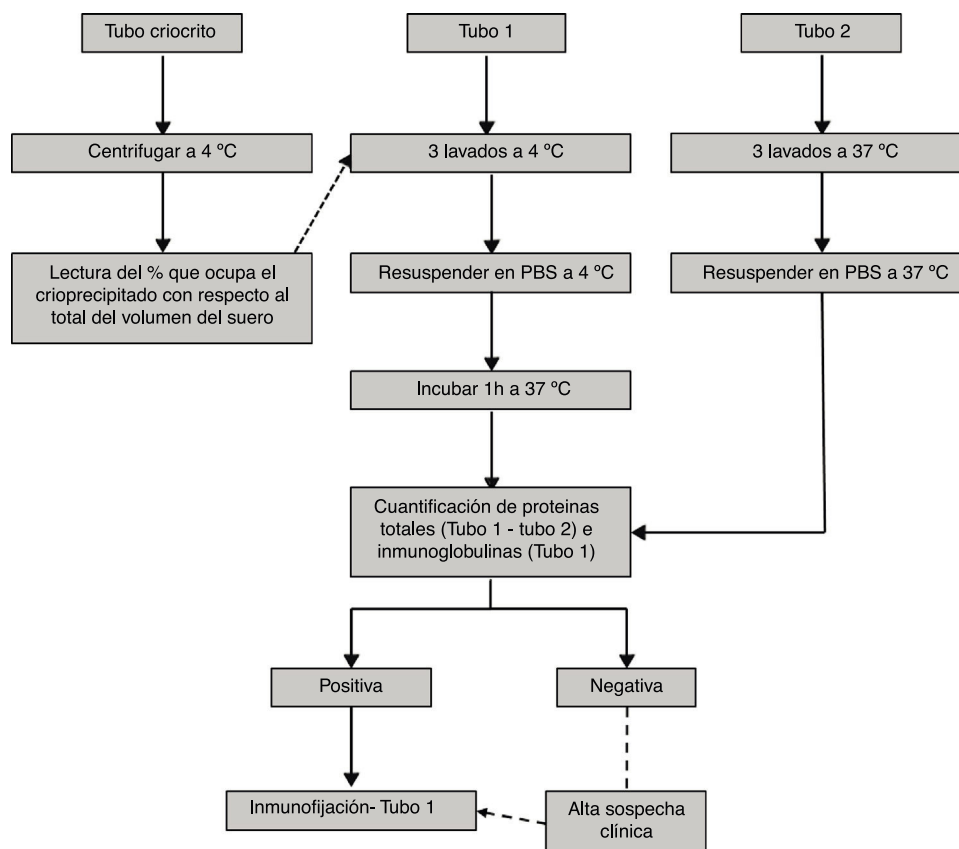


Figura 3 Protocolo de laboratorio para el estudio de crioglobulinas. IF: inmunofijación.

inter-laboratorio, creemos que el método más sensible^{46,47}, que aporta tanto la clase de crioglobulina como la clonalidad (información clínicamente relevante) y disponible en la mayoría de los laboratorios es la inmunofijación. Esta debe realizarse del crioprecipitado lavado a 4 °C y resuspendido a 37 °C. El procedimiento de laboratorio recomendado se indica en la [figura 3](#).

Pruebas complementarias

Dentro de los criterios diagnósticos de síndromes crioglobulinémicos se incluyen la determinación del FR y el C4. Además, es de utilidad determinar los reactantes de fase aguda y completar el estudio del complemento (C1q, C2, C3, y CH50) en la primera determinación⁴⁸, así como cuantificar las inmunoglobulinas tanto en la primera determinación como en determinaciones posteriores⁴⁹. Otra aproximación para completar el estudio de crioglobulinas es la cuantificación de inmunoglobulinas en el sobrenadante que queda tras dejar precipitar 5-7 días a 4 °C³⁵. El FR y los reactantes de fase aguda están normalmente elevados. Los factores del complemento de la vía clásica (principalmente el C4)²⁵ se encuentran disminuidos en las crioglobulinemias mixtas, aunque también pueden estarlo en las simples¹⁹. Sin embargo, el C3 se encuentra dentro de los rangos de normalidad o incluso ligeramente elevado debido a un mecanismo regulador ejercido por C4bp y factor I sobre la C3 convertasa de la vía clásica en estos pacientes⁵⁰. Estas alteraciones serológicas de manera independiente han

llevado al diagnóstico erróneo de vasculitis reumatoidea al no considerarse la presencia de crioglobulinas²⁹, por lo que no deberían emplearse de manera aislada a la detección de crioglobulinas, sino de forma complementaria.

En pacientes positivos para crioglobulinas de tipo I y carentes de diagnóstico de base sería recomendable realizar un proteinograma del suero para descartar desórdenes hematológicos¹⁹. En los pacientes con crioglobulinemia mixta es preciso estudiar los marcadores de infección para el VHC, dada la alta asociación, en caso de que el paciente no esté ya diagnosticado de dicha hepatitis viral^{51,52}. También es recomendable realizar un estudio de los marcadores de infección para otros virus (VHB, VIH)^{3,11}, así como un cribado autoinmune^{10,12,21,53}.

Conclusiones y discusión

La detección de crioglobulinas es imprescindible para el diagnóstico de síndromes crioglobulinémicos. La naturaleza de las crioglobulinas y el propio mecanismo de crioprecipitación hacen que el procedimiento analítico sea muy largo (aproximadamente 7 días) y difícil de automatizar e incluso estandarizar. No obstante, es importante homogeneizar en lo posible el protocolo de caracterización de crioglobulinas entre los diferentes laboratorios. En un estudio realizado en 2008⁵⁴ se constató la gran variabilidad en la determinación de crioglobulinas. De los 140 laboratorios participantes en la encuesta solo un 36% empleaba algún método que garantizara que la temperatura no cayera de los 37 °C hasta la

separación del suero. En cuanto a la fase de crioprecipitación, el tiempo resultó ser muy variable, de 12 h a 9 días, con un 30% de los laboratorios que dejaba menos de 3 días de precipitación a 4 °C antes de la fase de detección. Tras la crioprecipitación, el 21% de los laboratorios no resolubilizaba el crioprecipitado a 37 °C. En lo referente al análisis, solo el 42% empleaba algún método cuantitativo, y el 37% no caracterizaba el tipo de crioglobulina, informando únicamente la concentración de crioprecipitado como criocrito, concentración proteica total y/o concentración de inmunoglobulinas. Solo 3 laboratorios (2%) proporcionaban unos valores de referencia específicos para la cantidad total de proteínas del crioprecipitado y ninguno para la concentración de inmunoglobulinas.

La fase más crítica para la detección de crioglobulinas es la preanalítica. Para la recogida de muestra es recomendable, aunque no imprescindible, el precalentamiento del material de extracción^{1,17,36,39,55,56} dado que ni el tiempo ni la caída de temperatura durante los segundos que dura la extracción son suficientes para permitir que las crioglobulinas precipiten. Al igual que la mayoría de los protocolos publicados hasta la fecha consideramos que es crucial el transporte de la muestra al laboratorio a 37 °C, así como la incubación 1 h a 37 °C para evitar falsos negativos por precipitación de crioglobulinas previa separación del suero. Para dicha separación centrifugar a 37 °C, pero en caso de que el laboratorio no disponga de esta opción, es preferible centrifugar a temperatura ambiente⁵⁷ a dejar sedimentar, puesto que al centrifugar se obtiene un suero con menos trazas de hematíes y fibrina, elementos que interfieren en la posterior determinación de crioglobulinas, dando lugar a falsos positivos. El riesgo de obtener un falso positivo de este modo es mayor al de obtener un falso negativo por precipitación de crioglobulinas durante la centrifugación a temperatura ambiente, dado que a esta temperatura solo serán capaces de precipitar parcialmente algunas crioglobulinas de tipo I que se encuentren a muy alta concentración, pero seguirán quedando solubles en su mayor parte y detectables en su posterior análisis^{35,39}.

Obtenido el suero, este debe dejarse a 4 °C para que se produzca la crioprecipitación. El tiempo adecuado es variable según los autores, desde un mínimo de 21⁴⁴ o 3 días^{18,32,36,39} hasta 7^{6,11,15-17,20,27,35,37,51,55,58}. Una incubación de menos de 5 días puede conllevar hasta un 30% de falsos negativos debido a que las crioglobulinas de tipo III son más lentas en precipitar³⁵. Por tanto, las muestras se deben incuban a 4 °C de 5 a 7 días. Finalizado el tiempo de incubación, lo más extendido es catalogar como negativas aquellas muestras sin precipitado visible. Lo más adecuado sería realizar el procedimiento completo a todas las muestras dado que en las crioglobulinas que se encuentran a más baja concentración pueden interferir lípidos (especialmente quilomicrones) y fibrinógeno y no ser observables a simple vista²⁹. Además, por motivos procedimentales, algunas muestras se incuban menos de 5 días, tiempo que puede ser insuficiente para que precipiten y que conllevaría falsos negativos. En todas estas situaciones sería recomendable que, al menos en pacientes con alta sospecha diagnóstica, se realizara la determinación completa aunque no se observe precipitado^{6,42}.

En el procesamiento de las muestras durante la fase analítica, proponemos que el crioprecipitado se someta a 3 lavados a 4 °C, número de lavados óptimo para eliminar proteínas contaminantes y perder el mínimo de crioprecipitado⁴². En lo referente a los métodos para la caracterización del crioprecipitado, es aconsejable la combinación de un método cuantitativo seguido de uno cualitativo en las muestras positivas. Como método cuantitativo, muchos grupos recomiendan el criocrito^{6,14,16,17,36,44,55,58}. Por su poca reproducibilidad y falta de fiabilidad al comparar entre pacientes, no es un buen método para emplear de forma exclusiva, siendo aconsejable combinarlo con otro método cuantitativo³², como la cuantificación de inmunoglobulinas con reactivos capaces de detectar bajas concentraciones^{53,57}. La cuantificación de proteínas totales es una buena aproximación del crioprecipitado, al menos en las crioglobulinemias mixtas^{35,39,51}, dado que no se ha relacionado la cantidad de anticuerpos con el nivel de crioprecipitado, y este está constituido también por proteínas y factores del complemento, sobre todo en las crioglobulinemias asociadas a infecciones virales, en las que se encuentran antígenos víricos²⁵. Estas proteínas al crioprecipitar podrían ser causa directa del daño, dado que se encuentran en los tejidos lesionados de pacientes con crioglobulinemia^{59,60}. Al poder cuantificar de forma paralela una muestra a 37 °C y eliminar de este modo las interferencias debidas a proteínas que coprecipitan de forma inespecífica, no es necesario combinar la cuantificación de proteínas con otro método cuantitativo. Por último, como método cualitativo para la caracterización del crioprecipitado secundamos la mayoría de las recomendaciones de la bibliografía al proponer la inmunofijación del suero^{6,11,14,16-18,32,36,55,58}.

El objeto de esta revisión es, por tanto, la recomendación de un protocolo que elimine, o al menos disminuya, la gran variabilidad entre laboratorios tanto en la metodología de determinación como en el tipo de resultado informado.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses en la elaboración del presente manuscrito.

Agradecimientos

A todos los miembros del Grupo de inmuoquímica de la Sociedad Española de Inmunología por su colaboración en la revisión del presente documento.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.rce.2018.10.006](https://doi.org/10.1016/j.rce.2018.10.006).

Bibliografía

1. Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J med.* 1993;327:1490-5.

2. Dammacco F, Sansonno D. Antibodies to hepatitis C virus in essential mixed cryoglobulinemia. *Indian J Gastroenterol*. 1992;87:352–6.
3. Ferri C, la Civita L, Longombardo G, Zignego AL, Pasero G. Mixed cryoglobulinaemia: A cross-road between autoimmune and lymphoproliferative disorders. *Lupus*. 1998;7:275–9.
4. Wintrobe M, Buell M. Hyperproteinemia associated with multiple myeloma: With report of a case in which an extraordinary hyperproteinemia was associated with thrombosis of the retinal veins and symptoms suggesting Raynaud's disease. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1933; 52: 156–165.
5. Lerner AB, Watson CJ. Studies of cryoglobulins I: Unusual purpura associated with the presence of a high concentration of cryoglobulin (cold precipitable serum globulin). *Am J Med Sci*. 1947;214:410–5.
6. Ramos-Casals M, Stone JH, Cid MC, Bosch X. The cryoglobulinaemias. *Lancet*. 2012;379:348–60.
7. Takada S, Shimizu T, Hadano Y, Matsumoto K, Kataoka Y, Inoue T, et al. Cryoglobulinemia (Review). *Mol Med Rep*. 2012;6:3–8.
8. Ragab G, Hussein MA. Vasculitic syndromes in hepatitis C virus: A review. *J Adv Res*. 2017;8:99–111.
9. Gytoku Y, Abdelmoula M, Spertini F, Izui S, Lambert PH. Cryoglobulinemia induced by monoclonal immunoglobulin G rheumatoid factors derived from autoimmune MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *J Immunol*. 1987;138:3785–92.
10. Ramos-Casals M, Cervera R, Yagüe J, García-Carrasco M, Trejo O, Jiménez S, et al. Cryoglobulinemia in primary Sjögren's syndrome: Prevalence and clinical characteristics in a series of 115 patients. *Semin Arthritis Rheum*. 1998;28:200–5.
11. Bonnet F, Pineau JJ, Taupin JL, Feyler A, Bonarek M, se Witte S, et al. Prevalence of cryoglobulinemia and serological markers of autoimmunity in human immunodeficiency virus infected individuals: A cross-sectional study of 97 patients. *J Rheumatol*. 2003;30:2005–10.
12. García-Carrasco M, Ramos-Casals M, Cervera R, Trejo O, Yagüe J, Sisó A, et al. Cryoglobulinemia in systemic lupus erythematosus: Prevalence and clinical characteristics in a series of 122 patients. *Semin Arthritis Rheum*. 2001;30:366–73.
13. Ramos-Casals M, Muñoz S, Medina F, Jara LJ, Rosas J, Calvo-Alen J, et al. Systemic autoimmune diseases in patients with hepatitis C virus infection: Characterization of 1020 cases (the HISPAMEC Registry). *J Rheumatol*. 2009;36:1442–8.
14. Ferri C, Zignego AL, Pileri SA. Cryoglobulins. *J Clin Pathol*. 2002;55:4–13.
15. Tedeschi A, Baratè C, Minola E, Morra E. Cryoglobulinemia. *Blood Rev*. 2007;21:183–200.
16. Harel S, Mohr M, Jahn I, Aucouturier F, Galicier L, Asli B, et al. Clinico-biological characteristics and treatment of type I monoclonal cryoglobulinaemia: A study of 64 cases. *Br J Haematol*. 2015;168:671–8.
17. Muchtar E, Magen H, Gertz MA. How I treat cryoglobulinemia. *Blood*. 2016;129:289–99.
18. Damoiseaux J. The diagnosis and classification of the cryoglobulinemic syndrome. *Autoimmun Rev*. 2014;13:359–62.
19. Terrier B, Karras A, Kahn JE, le Guenno G, Marie I, Benarous L, et al. The spectrum of type I cryoglobulinemia vasculitis. *Medicine (Baltimore)*. 2013;92:61–8.
20. Musset L, Duarte F, Gaillard O, Thi Hueong Du L, Bilala J, Galli J, et al. Immunochemical characterization of monoclonal IgG containing mixed cryoglobulins. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;70:166–70.
21. Lamprecht P, Gause A, Gross WL. Cryoglobulinemic vasculitis. *Arthritis Rheum*. 1999;42:2507–16.
22. Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME. Diagnostic criteria in autoimmune diseases. 1st ed. Totowa: Humana Press; 2008.
23. Tomana M, Schrohenloher RE, Koopman WJ, Alarcon GS, Paul WA. Abnormal glycosylation of serum IgG from patients with chronic inflammatory diseases. *Arthritis Rheum*. 1988;31:333–8.
24. Middaugh CR, Litman GW. Atypical glycosylation of an IgG monoclonal cryoimmunoglobulin. *J Biol Chem*. 1987;262:3671–3.
25. Dammacco F, Sansonno D, Piccoli C, Tucci F, Racanelli V. The cryoglobulins: An overview. *Eur J Clin Invest*. 2001;31: 628–38.
26. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*. 2013;65:1–11.
27. Ferri C. Mixed cryoglobulinemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:25–42.
28. De Vita S, Soldano F, Isola M, Monti G, Gabrielli A, Tzioufas A, et al. Preliminary classification criteria for the cryoglobulinaemic vasculitis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1183–90.
29. Shihabi ZK. Cryoglobulins: An important but neglected clinical test. *Ann Clin Lab Sci*. 2006;36:395–408.
30. Dispenzieri A, Gorevic PD. Cryoglobulinemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1999;13:1315–49.
31. Rodríguez González T, Jiménez J. Crioglobulinas: características y metodología de estudio. Recomendación (2014). *Rev Lab Clin*. 2016;9:124–30.
32. Sargur R, White P, Egner W. Cryoglobulin evaluation: Best practice? *Ann Clin Biochem*. 2010;47:8–16.
33. Basile U, Torti E, dell'Abate MT, Colacicco L, Gulli F, Zuppi C, et al. Pre-analytical phase in cryoglobulin (CRG) detection: An alternative method for sample transport. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54:e123–6.
34. Nahm MH, Chatham WW, Benjamin WH. Device for carrying blood samples at 37 °C for cryoglobulin test. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19:1555–6.
35. Kallemuchikkal U, Gorevic PD. Evaluation of cryoglobulins. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123:119–25.
36. Motyckova G, Murali M. Laboratory testing for cryoglobulins. *Am J Hematol*. 2011;86:500–2.
37. Okuse C, Yotsuyanagi H, Okazaki T, Yasuda K, Fujioka T, Tomoe M, et al. Detection, using a novel method, of a high prevalence of cryoglobulinemia in persistent hepatitis C virus infection. *Hepatol Res*. 2003;27:18–22.
38. Adam C, Morel-Maroger L, Richet G. Cryoglobulins in glomerulonephritis not related to systemic disease. *Kidney Int*. 1973;3:334–41.
39. Michaud M, Moulis G, Puissant B, Balardy L, Huart A, Gaches F, et al. Cryofibrinogenemia: A marker of severity of cryoglobulinemic vasculitis. *Am J Med*. 2015;128:916–21.
40. Musset L, Diemert MC, Taibi F, Thi Huong Du L, Cacoub P, Leger JM, et al. Characterization of cryoglobulins by immunoblotting. *Clin Chem*. 1992;38:798–802.
41. Romitelli F, Pucillo LP, Basile U, di Stasio E. Comparison between the traditional and a rapid screening test for cryoimmunoglobulins detection. *Biomed Res Int*. 2015;2015:783063.
42. Vermeersch P, Gijbels K, Knockaert D, Blockmans D, Westhovens R, Mariën G, et al. Establishment of reference values for immunoglobulins in the cryoprecipitate. *Clin Immunol*. 2008;129:360–4.
43. Yang LC, Norman ME, Doughty RA. A micromethod for the analysis of cryoglobulins via laser nephelometry: Evaluation and comparison to C1q binding activity in autoimmune diseases in pediatrics. *Pediatr Res*. 1980;14:858–62.
44. Okazaki T, Nagai T, Kanno T. Gel diffusion procedure for the detection of cryoglobulins in serum. *Clin Chem*. 1998;44:1558–9.
45. Kalovidouris AE, Johnson RL. Rapid cryoglobulin screening: An aid to the clinician. *Ann Rheum Dis*. 1978;37:444–8.
46. Litwin CM, Anderson SK, Philipps G, Martins TB, Jaskowski TD, Hill HR. Comparison of capillary zone and immunosubtraction with agarose gel and immunofixation electrophoresis for

- detecting and identifying monoclonal gammopathies. *Am J Clin Pathol*. 1999;112:411–7.
47. Sargentini V, D'Alessandro M, Angeloni A, Bachetoni A. Comparison of the first fully automated agarose gel electrophoresis system with the capillary electrophoresis method for the identification of monoclonal immunoglobulins. *Riv Ital della Med. di Lab*. 2015;11:47–9.
 48. Gorevic PD. Rheumatoid factor, complement, and mixed cryoglobulinemia. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:439018.
 49. Steere AC, Hardin JA, Ruddy S, Mummaw JG, Malawista SE. Correlation of serum and cryoglobulin IgM with activity, and serum IgG with remission. *Arthritis Rheum*. 1979;22:471–83.
 50. Haydey RP, de Rojas MP, Gigli IA. Newly described control mechanism of complement activation in patients with mixed cryoglobulinemia (cryoglobulins and complement). *J Invest Dermatol*. 1980;74:328–32.
 51. Cicardi M, Cesana B, del Ninno E, Pappalardo E, Silini E, Agostoni A, et al. Prevalence and risk factors for the presence of serum cryoglobulins in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepatol*. 2000;7:138–43.
 52. Lauletta G, Russi S, Contedua V, Sansonno L. Hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:502156.
 53. Weisman M, Zvaifler N. Cryoimmunoglobulinemia in rheumatoid arthritis. Significance in serum of patients with rheumatoid vasculitis. *J Clin Invest*. 1975;56:725–39.
 54. Vermeersch P, Gijbels K, Mariën G, Lunn R, Egner W, White P, et al. A critical appraisal of current practice in the detection, analysis, and reporting of cryoglobulins. *Clin Chem*. 2008;54:39–43.
 55. Monti G, Saccardo F, Castelnovo L, Novati P, Sollima S, Riva A, et al. Prevalence of mixed cryoglobulinaemia syndrome and circulating cryoglobulins in a population-based survey: The Origlio study. *Autoimmun Rev*. 2014;13:609–14.
 56. Voma CB, Levinson SS. Analysis, detection and quantitation of mixed cryoglobulins in HCV infection: Brief review and case examples. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54:1853–9.
 57. Kolopp-Sarda MN, Miossec P. Cryoglobulins: An update on detection, mechanisms and clinical contribution. *Autoimmun Rev*. 2018;17:457–64.
 58. Eble V, Legallier B, Joly P, Vittecoq O, Caron F, Tamion F, et al. Long term outcome of patients with low level of cryoglobulin (<0.05 g/L). *Autoimmun Rev*. 2016;15:440–6.
 59. Sansonno D, Gesualdo L, Manno C, Schena FP, Dammacco F, Hepatitis C. Virus-related proteins in kidney tissue from hepatitis C virus-infected patients with cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis. *Hepatology*. 1997;25:1237–44.
 60. Sansonno D, Dammacco F. Hepatitis C virus, cryoglobulinaemia, and vasculitis: Immune complex relations. *Lancet Infect Dis*. 2005;5:227–36.