

Anton SZYMANOWICZ<sup>1,\*</sup>, Christophe DOCHE<sup>2,\*\*</sup>, Marie-Pierre COULHON<sup>3</sup>, Bernadette HENNACHE<sup>4</sup>, Henri COQUELIN<sup>5</sup>, Christophe HESS<sup>6</sup>, Zoulikha BERKANE<sup>7</sup>, Monique CAILLIEZ<sup>8</sup>, Brigitte ONREAD<sup>4</sup>.  
Groupe de travail « Cryoglobulines » du Collège National de Biochimie des Hôpitaux (CNBH)

## Détection, caractérisation et interprétation des cryoglobulines, recommandations du groupe de travail « Cryoglobulines » du Collège National de Biochimie des Hôpitaux

### RÉSUMÉ

Le dosage et l'analyse des cryoglobulines constituent un examen dont la fréquence de prescription a augmenté de façon significative ces dernières années. Cet examen ne bénéficie toutefois d'aucune possibilité de contrôle qualité et sa qualité repose donc sur la bonne maîtrise technique du laboratoire. Les enjeux associés à cette problématique ont conduit le Collège National de Biochimie des Hôpitaux (CNBH) à mettre sur pied un groupe de travail dédié à ce sujet. Cet article synthétise les résultats des travaux menés par les membres de ce groupe. Après une rapide description de la méthodologie des travaux réalisés, nous présentons sous un angle didactique l'ensemble des points à considérer aux niveaux des phases pré-analytique, analytique et d'interprétation afin de faciliter et d'optimiser les étapes nécessaires à la réalisation de cette analyse. Cet article et l'ensemble des travaux produits par notre groupe de travail ont été réalisés afin d'inciter un nombre plus important de laboratoires à prendre en charge cette analyse. Les précautions pré-analytiques, les choix analytiques et les principes de l'interprétation préconisés peuvent être aisément mis en œuvre dans tout laboratoire ; l'ensemble de recommandations proposées est cohérent avec la démarche qualité essentielle au bon fonctionnement d'un laboratoire de biologie médicale.

### MOTS-CLÉS

Cryoglobuline, identification immunologique, immunoglobuline, purpura vasculaire

### Detection, characterization and results interpretation of cryoglobulins A practical protocol proposed by the National College of Hospital Biochemistry "Cryoglobulines" working group

#### SUMMARY

*The prescription frequency of cryoglobulins determination and characterization has increased significantly over these last few years. However, this analysis does not benefit from any possibility of quality control and its quality relies therefore on the good technical mastery of the laboratory. The stakes associated with this set of problems have led the "Collège National de Biochimie des Hôpitaux" (National College of Hospital Biochemistry) to set up a working group dedicated to this topic. This article synthesizes the results of the work carried out by the members of this group. After a rapid description of the methodology of our work, we present under a didactic angle the different pre-analytical and analytical points to be considered in order to facilitate and to optimize the steps necessary to the realization of this analysis. This article and the work produced by our group were carried out in order to encourage more laboratories to take charge of this analysis. All of our recommendations should be easily applied in any laboratory and are coherent with the quality process necessary for the correct operation of a clinical chemistry laboratory.*

#### KEYWORDS

*Cryoglobulinemia, immunological identification, immunoglobulin, vascularis purpura*

\* Pour correspondance

\*\* Coordonnateur du groupe

<sup>1</sup> CH de Roanne – Laboratoire de biochimie – 28, rue de Charlieu – 42328 Roanne cedex – E-Mail : anton.szymanowicz@ch-roanne.fr

<sup>2</sup> CH de Chambéry – Service de biochimie et immunologie 7, square Massalaz, BP 1125 – 73011 Chambéry

<sup>3</sup> CH René Dubos – Laboratoire de biologie – 6, avenue de l'Île de France – BP 79 – 95300 Pontoise

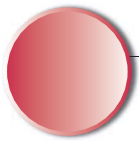
<sup>4</sup> CHRU de Lille – Hôpital Cardiologique – Laboratoire de biochimie – bd Jules Leclerc – 59037 Lille

<sup>5</sup> CH St-Joseph St-Luc – Service de biologie médicale – 20, quai Claude Bernard – 69007 Lyon

<sup>6</sup> CH Ste-Catherine – Laboratoire de biologie médicale – 19, côte de Saverne BP 105 – 67703 Saverne

<sup>7</sup> CH P. Vitter – 5, rue Arsenal – 70100 Gray

<sup>8</sup> CH Saint-Denis – Hôpital Delafontaine – 2, rue Du Dr Delafontaine 93205 – Saint-Denis



## I - Introduction

Les cryoglobulines constituent des complexes multimoléculaires composés d'une ou plusieurs classes d'immunoglobulines, associées parfois à d'autres protéines qui ont la propriété de précipiter à basse température et de se redissoudre par réchauffement du sérum à 37 °C (1-4). Elles peuvent accompagner de nombreuses maladies : hémopathies lymphoplasmocytaires, maladies immunoprolifératives et maladies inflammatoires chroniques auto-immunes, infectieuses ou virales (4-6). Les symptômes qu'elles provoquent sont inconstants et variés, provoqués par des dépôts de complexes immuns avec activation du complément entraînant généralement une diminution de la fraction C4. Les manifestations cliniques sont le plus fréquemment des atteintes cutanées (purpura vasculaire), des troubles vasomoteurs (syndrome de Raynaud) et des lésions neurologiques (7), rénales ou d'autres viscères plus rarement (*tableau I*). Elles sont un motif d'aggravation de la maladie causale ou parfois le signe précurseur de ces maladies. Les principales étiologies des cryoglobulines sont présentées dans le Tableau II. L'ensemble de ces raisons donne à leur recherche toute son utilité (8). La classification de JC Brouet (9) et celle qui résulte de sa révision par D. Le Carrer font référence depuis de nombreuses années.

La première dont la publication date de 1974 dénombre 3 principaux types de cryoglobulines, la seconde différenciée à la fin des années 1980 se caractérise par l'addition d'un type supplémentaire. Ce sous-type correspond à la présence d'immunoglobulines oligoclonales chez certains patients, très facilement mise en évidence par les techniques d'immunofixation. Il existe des liens forts entre le type de cryoglobuline identifiée par le laboratoire et la symptomatologie clinique ou la maladie causale. Cet examen présente en conséquence un intérêt indéniable (1, 6, 8, 9) et doit être réalisé dans les conditions les plus conformes à l'état des connaissances actuelles et avec des moyens d'analyse biochimique appropriés.

En revanche, il ne semble pas exister de parallélisme entre la concentration d'une cryoglobuline et l'importance des signes cliniques observés (1) à l'exception du rare syndrome d'hyperviscosité sanguine consécutif à une importante cryoglobuline de type I d'isotype IgM le plus souvent. Toutefois, certaines équipes souhaitent suivre leurs patients par des dosages itératifs de cryoglobulines, notamment pour vérifier l'efficacité d'un traitement antiviral (6) ou, éventuellement, pour apprécier de façon plus objective l'aggravation des signes cliniques observés. Cette pratique encore très marginale paraît cependant parfaitement cohérente et mériterait la réalisation d'études sur

**Tableau I**

Principales manifestations cliniques des cryoglobulines.

<p><b>1. Manifestations cutanées (très fréquentes 55 % des cas)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Purpura vasculaire pétéchial (le plus fréquent) prédominant aux membres inférieurs</li> <li>• Ulcère des jambes</li> <li>• Nodules, lésions bulleuses ou vésiculeuses</li> <li>• Purpura nécrotique</li> <li>• Urticaire survenant au froid</li> <li>• Gangrène distale</li> </ul>
<p><b>2. Manifestations vaso-motrices</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Syndrome de Raynaud (15 % des cas)</li> <li>• Acrocyanose des extrémités</li> <li>• Livedo reticularis ou nécrose cutanée pouvant toucher le nez, les oreilles ou les membres</li> </ul>
<p><b>3. Manifestations rénales (atteinte viscérales les plus fréquentes 30 % des cas)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glomérulonéphrite membrano-proliférative avec protéinurie et hématurie</li> </ul>
<p><b>4. Manifestations articulaires (fréquente 50 à 70 % des cas)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Arthralgies inflammatoires</li> <li>• Arthrites des mains, des genoux et des chevilles</li> </ul>
<p><b>5. Manifestations neurologiques (dans 30 % des cas)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polynévrites</li> <li>• Neuropathies périphériques</li> </ul>
<p><b>6. Autres manifestations viscérales</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Atteintes hépatiques non spécifiques</li> <li>• Vascularite intestinale avec douleur et/ou hémorragies, parfois nécroses intestinales</li> <li>• Atteinte pulmonaire clinique (très rare) mais signes radiologiques d'atteinte interstitielle dans 75% des cas de cryoglobulines essentielles</li> </ul>
<p><b>7. Autres manifestations cliniques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Syndrome d'hyperviscosité lorsque l'Ig monoclonale est présente à un taux important (rare) avec troubles neuro-sensoriels et hémorragies au niveau des muqueuses</li> <li>• Signes ophtalmologiques consécutifs aux troubles circulatoires (hémorragies ou thromboses)</li> <li>• Syndrome sec</li> </ul>

## Détection, caractérisation et interprétation des cryoglobulines, recommandations du groupe de travail « Cryoglobulines » du Collège National de Biochimie des Hôpitaux

**Tableau II**

Principales étiologies des cryoglobulines.

<p><b>1. Syndromes lymphoprolifératifs (cryoglobuline de type I et II)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Maladie de Waldenström (dans 7 à 20 % des cas)</li> <li>• Myélome (dans 5 à 10 % des cas)</li> <li>• Plasmocytome</li> <li>• Lymphome non hodgkinien</li> <li>• Leucémie lymphoïde chronique (rarement)</li> <li>• Lymphadénopathie angio-immunoblastique</li> </ul>
<p><b>2. Maladies auto-immunes (cryoglobulines mixtes de type II ou III)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lupus érythémateux disséminé (dans 10 à 40 % des cas), syndrome de Gougerot-Sjögren, spondylarthrite ankylosante, syndrome de Behcet</li> <li>• Polyarthrite rhumatoïde, périartérite noueuse, polymyosite, sclérodémie, cirrhose biliaire, syndrome de Kawasaki, polymyosite,</li> <li>• Maladie chronique des agglutinines froides</li> <li>• Anémies hémolytiques auto-immunes</li> <li>• Purpura thrombopéniques idiopathiques</li> <li>• Purpura rhumatoïde</li> </ul>
<p><b>3. Maladies infectieuses (cryoglobulines mixtes de type II ou III de caractère transitoire)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Affections virales : virus d'Epstein Barr, cytomegalovirus, herpes, VIH, hépatite virale A, B, C (dans 40 à 90 % des cas).</li> <li>• Affections bactériennes : streptocoque (endocardite d'Osler), staphylocoque, syphilis, lèpre, brucellose, tuberculose pulmonaire, fièvre Q</li> <li>• Affections parasitaires : toxoplasmose, paludisme, leishmaniose, trypanosomiase, bilharziose</li> <li>• Affections fongiques : coccidioïdomycose</li> </ul>
<p><b>4. Maladies rénales ou hépatiques (cryoglobulines de type II ou III)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glomérulonéphrites aiguës post-streptococciques ou membrano-prolifératives</li> <li>• Cirrhose, hépatopathies chroniques</li> </ul>
<p><b>5. Cryoglobulinémies mixtes essentielles (type II ou III, dans 15 % des cas)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• parfois asymptomatiques, sans aucune cause trouvée initialement ; le plus souvent manifestations précurseurs d'une néoplasie ou d'une hépatite virale C. Nécessite une surveillance car maladie sous-jacente en cours d'évolution.</li> </ul>

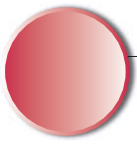
un nombre significatif de cas afin d'en valider les indications. Cette proposition est induite par l'amélioration significative récente des techniques d'isolement et de dosage. En effet, la présence d'une cryoglobuline peut aggraver le pronostic de la maladie en particulier dans les néphropathies (1). En revanche, certaines cryoglobulines peuvent être totalement asymptomatiques (11). Devant cette problématique complexe, un groupe de travail émanant du Collège National de Biochimie des Hôpitaux (CNBH) a réalisé un état des lieux des pratiques. Un certain nombre de celles-ci se sont révélées convergentes et confortées par plusieurs publications d'équipes caractérisées par un savoir-faire et une connaissance du sujet reconnus (1-11). Nous proposons dans ces pages une synthèse des résultats du travail de réflexion mené par notre groupe de biologistes hospitaliers « très proches du terrain ». Notre propos consistera essentiellement à développer l'angle analytique de ce sujet en proposant des recommandations permettant de mener à bien une analyse de cryoglobuline et d'obtenir des résultats conformes sur les plans qualitatifs et quantitatifs. Ces recommandations, validées par le groupe de travail, portent sur les items les plus utiles pour l'interprétation et l'identification immunologique de ces immunoglobulines insolubilisées par le froid. Cette publication s'inscrit en complément d'un article publié à la fin de l'année 2006 et faisant part de l'expérience technique d'un des sites impliqué dans ce groupe de travail (Laboratoire de Biochimie du Centre

hospitalier de Roanne) (12). L'objectif du présent article est de permettre une réalisation fiable et reproductible de cette analyse par le plus grand nombre de laboratoires. Cette amélioration apparaît essentielle car sa fréquence de prescription est aujourd'hui en nette augmentation. De fait, les spécialistes de médecine interne sont depuis quelques années plus enclins à prescrire la recherche de cryoglobulines en raison de ses indications élargies aux atteintes hépatiques virales, dont notamment l'hépatite chronique C (3, 4, 13), et aux pathologies dysimmunitaires associées au grand âge de certaines populations de patients hospitalisés. On remarquera aussi que ce regain d'intérêt est également en parti dû à l'amélioration progressive de la capacité des laboratoires à répondre aux investigations prescrites par les cliniciens.

## II - Matériel et méthode

### 1. Méthodologie de l'étude

Notre étude s'est articulée en plusieurs étapes. La première de celles-ci, réalisée au cours de l'année 2003, a consisté à mettre en place un groupe de travail dédié constitué de neuf biologistes hospitaliers expérimentés et intéressés par la problématique des cryoglobulines. Dans un second temps, une réunion de travail destinée à définir la stratégie de conduite des travaux a permis la mise en commun de l'ensemble des pratiques respectives



## NOTE 1

Disponible auprès de la société Cryobiosystem :  
10, rue Clémenceau  
BP 81  
61302 L'Aigle cedex  
Tél. : 01 49 24 05 05  
<http://cryobiosystem-imv.com>

## NOTE 2

Disponible auprès de la société Odil :  
Parc Mazen Sully  
BP 76705  
21067 Dijon  
Tél. : 03 80 56 52 32  
[www.odil.fr](http://www.odil.fr)

## NOTE 3

Jouan – rue B.Sands  
– CP 3203  
44805 St-Herblain  
Tél.: 02 40 16 80 00

## NOTE 4

Disponible auprès de la société CML :  
1, rue des Palis  
BP 30  
77792 Nemours  
Tél. : 01 64 45 42 42  
[www.cml-france.com](http://www.cml-france.com)

des membres du groupe. Différents sous groupes formés de 2 ou 3 personnes ont pris en charge les items suivants : définition, phase pré-analytique, mise en évidence, quantification, typage, classification, aspect clinique, interprétation. Un coordonnateur s'est chargé de la centralisation et de la classification des informations. Une phase de réflexion et de recherche bibliographique a permis la maturation du sujet. Un atelier animé par des praticiens référents biologistes et cliniciens, lors du 34<sup>e</sup> Colloque National des Biologistes des Hôpitaux (Colloque du SNBH, Perpignan 2005, (14)), a permis une première restitution des travaux. Les travaux de synthèse et de rédaction ont été pris en charge par l'un des membres du groupe, Anton Szymanowicz (Centre hospitalier de Roanne). Une présentation des conclusions a été réalisée par une communication par affiche lors du 35<sup>e</sup> Colloque du SNBH (Saint-Malo, septembre 2006 (15)). La version finale de ces travaux est communiquée dans cet article avec notamment l'établissement du niveau de consensus obtenu pour les 24 items constituant cette analyse.

## 2. Obtention des échantillons

La température à laquelle une cryoglobuline est susceptible de précipiter est variable d'un patient à un autre et peut être aussi élevée que 36 °C. Cette caractéristique implique qu'une grande rigueur s'impose au niveau de la qualité du prélèvement, de son acheminement et de sa prise en charge au laboratoire.

Seuls les laboratoires connaissant bien les problèmes posés par la recherche et l'identification des cryoglobulines et respectant les précautions pré-analytiques listées ci-après sont susceptibles d'obtenir des résultats fiables (11). Dans le cas contraire des résultats faussement négatifs peuvent être rendus. Concernant l'étape pré-analytique :

- Le patient doit être à jeun depuis 12 h.
- Le patient ne doit pas nécessairement être placé dans une pièce à 37 °C.
- Il est essentiel que les tubes de prélèvement soient dépourvus de gel et de tout additif et soient préchauffés à 37 °C. La solution optimale consiste à utiliser 3 tubes secs, sous vide de 5 mL (ou 2 ou 3 tubes de 7 mL) pour obtenir un volume de sérum d'environ 5 mL. On notera que cette valeur est retenue par la majorité des équipes impliquées dans le groupe de travail exceptée celle de Chambéry qui privilégie un volume de 10 mL dans un seul tube pour augmenter la sensibilité de la méthode.
- L'acheminement au laboratoire doit être effectué au moyen d'un dispositif permettant de maintenir la température à 37 °C, par exemple une valisette thermostatée de 15 litres type Coleman (réf : ZS391-007003, voir note 1) chauffée à 37-39 °C. Ce matériel est utilisé comme navette de transport selon un mode opératoire à établir localement. Tout autre mode de transport garantissant le maintien d'une température à 37 °C de manière propre et sécurisée peut aussi convenir mais pré-

sente une fiabilité plus réduite. Certains sites ont expérimenté avec satisfaction des pochettes isolantes (réf : Spiac, voir note 2) contenant des coussins thermiques (CH de Pontoise) ou des bouteilles thermos remplies de sable de Fontainebleau maintenues en permanence dans une étuve à 37 °C (CH de Chambéry). Pour un centre hospitalier de 1000 lits, il est optimal de disposer de 2 valisettes ou système équivalent, dont l'utilisation doit être gérée par une table de traçabilité indispensable au suivi de la localisation du matériel. Cette pratique permet la prise en charge d'environ 500 demandes d'analyses par an.

## 3. Obtention du cryoprécipité

Dès leur arrivée au laboratoire, les tubes doivent être placés dans une étuve à 37 °C (type Jouan réf : EB170, voir note 3) ou un dans un bloc chauffant. La coagulation s'effectue pendant au moins 2h, certaines équipes préconisent 5h au minimum sans toutefois dépasser 24h car il survient au-delà de cette durée un phénomène d'hémolyse. L'étuve doit être facilement accessible pour les services aux heures normales de fonctionnement du laboratoire. La centrifugation est réalisée à 3500 rpm pendant 15 minutes ou dans des conditions équivalentes, à 37 °C dans une centrifugeuse thermostatée (type Jouan SA modèle GT 422). L'utilisation de plots de centrifugation préalablement chauffés à 37 °C est possible et pratiquée par certains membres du groupe. Seul le respect le plus rigoureux de ces précautions pré-analytiques permet d'obtenir des résultats fiables.

Les conditions de réalisation de ces premières étapes pré-analytiques ont fait l'objet d'un accord unanime au sein du groupe de travail comme indiqué dans le Tableau III.

Après l'étape de centrifugation, 2 aliquotes de 2 mL, précisément mesurées avec une pipette automatique sont réparties dans 2 tubes stériles coniques en plastique transparent (Type réf. : TC4CS 5 mL, voir note 4) puis les tubes sont placés, à 4 °C. Un portoir identifié destiné à l'observation des cryoprécipités permet le rangement chronologique des échantillons par doublet.

Une troisième aliquote, correspondant au reliquat du prélèvement (0,5 à 1 mL) et maintenu à 37 °C, permet la réalisation éventuelle d'un bilan complémentaire. Dans ce cas, il convient de procéder immédiatement à une électrophorèse sérique et à un immunotypage (si nécessaire). En situation cliniquement ciblée, il peut être utile de faire le dosage des immunoglobulines IgA, IgG, IgM, du complément C1q, C2, C3, C4, CH50, du facteur rhumatoïde ainsi que de rechercher des auto-anticorps antinucléaires. Ce bilan sera éventuellement complété en fonction du diagnostic étiologique suspecté et selon les protocoles établis localement entre les cliniciens et le laboratoire. Il n'y a pas eu d'accord pour des recommandations sur ces bilans car les pratiques se sont révélées extrêmement diverses d'un hôpital à un autre.



## Détection, caractérisation et interprétation des cryoglobulines, recommandations du groupe de travail « Cryoglobulines » du Collège National de Biochimie des Hôpitaux

Les deux aliquotes entreposées à 4 °C sont quotidiennement observées sachant que la cryoprécipitation peut survenir en quelques heures pour les cryoglobulines de type I et de type II ou en plusieurs jours, le plus souvent, pour celles de type III. Le suivi des lectures s'effectue par un report des résultats sur une fiche type dont un modèle, adaptable en fonction des variantes spécifiques à chaque laboratoire, est présenté en Figure 1 ou par saisie directe dans le système de gestion de laboratoire lorsque celui-ci a été paramétré pour cette application (CH Saverne).

### 4. Lecture des cryoprécipités et interprétation de la lecture

Au bout de 10 jours, la recherche de cryoglobuline se révèle négative si le sérum est toujours clair et fluide dans les deux aliquotes entreposées à 4 °C, si aucun dépôt n'est visible au fond du tube conique et si aucune volute n'est visible par agitation manuelle douce du tube. Le libellé « recherche négative » est alors saisi par le technicien.

En cas de doute, une centrifugation est réalisée afin de déterminer si un culot est éventuellement présent. Si c'est effectivement le cas, l'échantillon sera traité comme positif.

Dans le cas où un flocculat d'apparence gélatineuse ou cristalline apparaît dans les deux tubes entreposés à 4 °C ou si un dépôt est visible au fond du tube, il convient alors de noter la positivité sur la fiche le jour même de la lecture. Le 10<sup>e</sup> jour au plus tôt les tubes considérés comme positifs sont présentés au biologiste qui confirmera la présence probable du cryoprécipité ainsi que son aspect. Dans tous les cas, il convient d'attendre 10 jours pour rendre la lecture définitive du résultat. En effet, certaines cryoglobulines de type III ne précipitent significativement qu'au bout de 5 à 6 jours (2) voire plus selon l'expérience des centres hospitaliers de Lille et de Lyon. Le délai de lecture a constitué un des points les plus argumentés lors de la mise en commun des expériences des membres du groupe. L'allongement de la période de lecture de 7 à 10 jours a d'ailleurs été retenu suite à cette confrontation. On notera que ce temps relativement plus long que ce qui est habituellement recommandé est également proposé par M. Olivier *et al.* (4).

Quant au test de thermosolubilisation du cryoprécipité, les limites de sa sensibilité et de sa spécificité ainsi que son interprétation qui reste trop subjective nous ont conduits à préconiser son abandon.

Dans le cas où des prélèvements itératifs sont réalisés plusieurs jours de suite pour le même patient (en général 2 ou 3 jours), chacun d'eux est traité et lu de la même façon car l'importance du cryoprécipité peut être légèrement variable d'un jour à l'autre.

### 5. Analyse du cryoprécipité

Tous les tubes d'un même patient présentant un cryoprécipité sont traités de façon similaire jusqu'au dosage des protéines totales. On utilise, pour le dosage un des tubes de chaque « doublet », celui

	Items	% d'accord
1	Patient à jeun de 12 h	100
2	Matériel de prélèvement à 37 °C	100
3	Tubes sec sans gel	100
4	Volume de 15 ml	89
5	Transport thermostaté à 37 °C	100
6	Coagulation entre 2 à 24 h à 37 °C	100
7	Centrifugation thermostatée à 37 °C	100
8	Centrifugation 15 min à 3500 rpm	100
9	Décantation de 2 fois 2 ml de sérum	89
10	Dans 2 tubes coniques en plastique placé à +4 °C	89
11	Lecture chaque jour	100
12	Pendant 10 jours	100
13	Lavage du précipité 3 fois par 2 ml de NaCl à +4 °C	77
14	Redissolution du précipité dans 100 µL de NaCl + 100 µL de Fluidil®	66
15	Redissolution 1 à 12h à 37 °C	100
16	Avec agitation au vortex pendant 1h la première et la dernière h	66
17	Dosage des protéines totales par une technique sensible de routine	89
18	Seuil pour réaliser l'immunotypage : 0,010 g/L	55
19	Typage par IFE	100
20	Interprétation selon la classification de Brouet et Le Carrer	89
21	Utilisation de texte prêt à l'emploi par axe	100
22	Utilisation d'une fiche de renseignements cliniques	89
23	Utilisation d'une fiche de réalisation technique	77
24	Conservation des traces pendant 20 ans	44

**Tableau III**

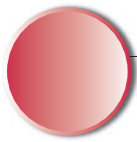
Résultats du niveau d'accord du groupe pour les différents points du protocole. Le calcul du niveau d'accord est fait par le rapport en % du nombre de biologistes d'accord avec la proposition divisé par l'effectif total du groupe.

CRYOGLOBULINES FICHE DE SUIVI DE LECTURE											N° de la feuille		
Lire chaque jour les sérums présents sur le portoir dans le réfrigérateur à +4°C													
Noter par (+) dès l'apparition d'un précipité ou la gélification du sérum													
Noter par (-) s'il n'y a aucun changement de l'aspect du sérum													
Noter le résultat du dosage dans la dernière colonne													
Fiche à conserver 1 an dans le classeur de travail du poste électrophorèses													
N° de travail	NOM/ Prénom	Date de prél	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	Dosage g/L

**Figure 1**

Fiche type pour le suivi des lectures des cryoglobulines.

présentant le précipité le plus abondant ; le second est gardé en réserve en cas d'incident de manipulation ou utilisé pour doubler la sensibilité de l'immunotypage en rassemblant les deux cryoprécipités lorsque cela est nécessaire. Cette organisation évite d'avoir à reprélever le patient, très souvent



## NOTE 5

Sebia – Parc  
technologique  
Léonard de Vinci  
CP 8010 Lisses  
– 91008 Evry  
Tél. : 01 69 89 80 80  
www.sebia.com

## NOTE 6

ELITech – 12 bis,  
rue Jean Jaurès  
92800 Puteaux  
Tél. : 01 41 45 07  
10 12  
www.elitechgroup.  
com

sorti de l'hôpital, avant le retour des résultats. Le précipité est isolé après centrifugation (3500 rpm x 15 min à 4 °C). Après élimination du surnageant, il est lavé 3 fois par une solution de chlorure de sodium à 0,9 %, maintenue à 4 °C, d'un volume égal au volume initial de sérum. L'équipe de Lille préfère réaliser un lavage par de l'eau distillée afin de diminuer les risques de perte de cryoglobulines pendant les étapes de lavage. Le culot est remis en suspension par agitation au vortex 20 secondes. Puis le mélange est centrifugé (3500 rpm x 15 min à 4 °C) afin d'éliminer toutes traces de protéines non cryoprécipitantes. Enfin, le cryoprécipité est redissous dans 100 µL d'une solution de chlorure de sodium isotonique additionnée de 100 µL de fluidil® (réf. : 4587, voir note 5). Le précipité est agité au vortex 20 secondes, puis placé une nuit à l'étuve à 37 °C. Il convient de vortexer 20 secondes tous les quarts d'heure pour favoriser la redissolution pendant la première heure de mise au bain-marie et la dernière heure qui précède le dosage. En fonction de l'importance du précipité, ce volume peut être modifié après concertation avec le biologiste. Le volume de reprise doit être précisément mesuré. Le biologiste appréciera ainsi l'importance du cryoprécipité lors de l'élaboration du commentaire selon le barème présenté dans le Tableau IV, un barème sensiblement modifié par rapport aux préconisations initiales de l'équipe de Roanne (12).

La concentration de la cryoglobuline peut alors être déterminée par la même méthode que celle mise en œuvre pour le dosage des protéines totales urinaires. Le résultat est recalculé pour exprimer le taux en g/L en tenant compte du facteur de concentration du précipité soit 10 (2 mL de sérum ramené à 200 µL de solution de redissolution). Le résultat brut du dosage est donc divisé par 10 pour ramener le taux de cryoglobuline par litre de sérum initial. Le laboratoire de Chambéry qui utilise un volume de sérum de 10 mL préconise la redissolution du précipité par 100 µL de sérum physiologique. Dans ce cas, la sensibilité du protocole est multipliée par un facteur 10 par rapport au protocole de base. Bien qu'intéressante pour la grande sensibilité qu'elle apporte, cette pratique n'a pas fait l'objet d'un consensus ; elle constitue toutefois une alternative à considérer lorsqu'une sensibilité maximale est recherchée pour des situations cliniques particulières.

Eventuellement, une dilution au 1/10 dans une solution de chlorure de sodium isotonique est appliquée au cas où le précipité est très abondant ou en

cas de dépassement de la limite de linéarité, une situation toutefois rarement rencontrée. Dans ce cas particulier, le résultat du dosage obtenu correspond à la concentration initiale du sérum d'origine.

Si le résultat du dosage est supérieur à 0,010 g/L, le libellé « cryoglobuline positive » et l'analyse d'identification sont déclenchés aussi par règle d'expertise. Une fiche (figure 2) est alors remplie en vue de l'identification immunologique par immunofixation (IFE) de la cryoglobuline. Nous recommandons l'utilisation de la méthode habituelle du laboratoire appliquée pour les IFE sériques ou urinaires. Si le laboratoire utilise une solution de la société Sebia la technique doit alors être réalisée conformément aux préconisations de ce fournisseur. Pour les utilisateurs du produit proposé par le groupe ELITech (note 6), il est recommandé d'utiliser des gels d'électrophorèse plutôt que des gels d'IFE, ceux-ci qui contiennent un réactif sensibilisant responsable de coprecipitations gênantes comme a pu le constater l'équipe lilloise.

La technique est en général adaptée sur un appareil semi-automatique. Le plus souvent, il faut omettre l'étape de dilution, afin d'obtenir la sensibilité maximale facilitant l'identification du type de la cryoglobuline isolée. Le groupe de travail n'a pas pu parvenir à un consensus concernant le seuil à retenir pour pratiquer l'IFE. Certaines équipes vont réaliser l'immunotypage dans tous les cas (Lyon, Lille, Pontoise, Chambéry) si le résultat du dosage de la cryoglobuline est supérieur à 3 mg/L ; la majorité a retenu le seuil de 10 mg/L. Des travaux sont encore nécessaires pour déterminer objectivement le seuil d'immunotypage compatible avec l'efficacité analytique, un intérêt clinique et donc un éventuel bénéfice pour le patient. De façon générale, les cliniciens n'accordent une signification à la découverte d'une cryoglobuline que pour des concentrations situées dans une fourchette de 0,020 à 0,040 g/L (14).

## 6. Interprétation de l'immunofixation

Dans le cas d'échantillons itératifs, l'IFE est réalisée sur l'isolat présentant la concentration la plus importante. Dans environ 2 à 5 % des cas de recherche positive avec une concentration de cryoglobulines comprise entre 0,010 et 0,030 g/L, l'identification des composants du cryoprécipité se révèle impossible. Ceci implique la saisie du commentaire « identification impossible de la cryoglobuline en raison d'une concentration inférieure au seuil de sensibilité de la méthode »

**Tableau IV**

Libellés pour l'axe  
quantitatif en vue de  
l'interprétation des  
cryoglobulines.

N°	Libellé	Élément déclenchant (g/L)
1	Cryoglobuline positive mais peu significative	< 0,1
2	Cryoglobuline en faible concentration	Compris entre 0,1 et 0,5
3	Cryoglobuline en concentration moyenne	Compris entre 0,5 et 1
4	Cryoglobuline en concentration importante	Compris entre 1 et 5
5	Cryoglobuline en concentration très importante	>5

## Détection, caractérisation et interprétation des cryoglobulines, recommandations du groupe de travail « Cryoglobulines » du Collège National de Biochimie des Hôpitaux

<b>fiche à compléter au poste de travail et à présenter au Biologiste pour validation (à archiver au laboratoire associée au dossier d'IFE)</b>	
Nom :	Prénom :
Service :	N° travail : /_____/
Date de la demande : /_/_/_____/	Date de rendu de l'examen : /_/_/_____/
<b>Renseignements cliniques :</b>	
<input type="checkbox"/> Syndrome de Raynaud	<input type="checkbox"/> Acrocyanose des extrémités
<input type="checkbox"/> Glomérulonéphrite MP	<input type="checkbox"/> Arthralgies inflammatoires
<input type="checkbox"/> Polynévrites	<input type="checkbox"/> Neuropathies périphériques
<b>Diagnostic principal :</b>	
<input type="checkbox"/> Hépatite virale	<input type="checkbox"/> Maladie autoimmune
Autre :	<input type="checkbox"/> Infection bactérienne
<input type="checkbox"/> Livedo réticularis	<input type="checkbox"/> Nécroses cutanées
<input type="checkbox"/> Arthrites	<input type="checkbox"/> Hyperviscosité sanguine
<b>Interprétation quantitative</b>	
<input type="checkbox"/> Peu significative (< 0,1 g/L)	<input type="checkbox"/> Faible (0,1 à 0,5 g/L)
<input type="checkbox"/> Importante (1 à 5 g/L)	<input type="checkbox"/> Très importante (> à 5 g/L)
Cryoglobuline : /_____/ g/L	
<b>Interprétation qualitative</b>	
Type :	
<input type="checkbox"/> I : monoclonale	
<input type="checkbox"/> II a : mixte monoclonale	
<input type="checkbox"/> II b : mixte oligoclonale	
<input type="checkbox"/> III : mixte polyclonale	
Isotypie monoclonale :	
<input type="checkbox"/> IgG Kappa	<input type="checkbox"/> IgG Lambd
<input type="checkbox"/> IgA Kappa	<input type="checkbox"/> IgA Lambda
<input type="checkbox"/> IgM Kappa	<input type="checkbox"/> IgM Lambda
<input type="checkbox"/> Kappa	<input type="checkbox"/> Lambda
Isotypie oligoclonale :	
<input type="checkbox"/> IgG Kappa	<input type="checkbox"/> IgG Lambda
<input type="checkbox"/> IgA Kappa	<input type="checkbox"/> IgA Lambda
<input type="checkbox"/> IgM Kappa	<input type="checkbox"/> IgM Lambda
<input type="checkbox"/> Kappa	<input type="checkbox"/> Lambda
Isotypie polyclonale :	
<input type="checkbox"/> IgG Kappa	<input type="checkbox"/> IgG Lambda
<input type="checkbox"/> IgA Kappa	<input type="checkbox"/> IgA Lambda
<input type="checkbox"/> IgM Kappa	<input type="checkbox"/> IgM Lambda
Autres et évolution :	
<b>Immuno-fixation</b>	
<b>Profil IgG IgA IgM K L</b>	
<b>Commentaire :</b>	

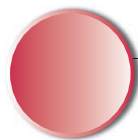
**Figure 2**

Fiche de travail

sur la fiche de travail. Ce cas est rarement rencontré et ne pose pas de problème au clinicien qui redemandera l'examen à distance, en fonction de l'évolution clinique du patient.

Lorsque l'IFE est terminée, le technicien présente au biologiste de signature la fiche de travail complétée par le profil électrophorétique coloré séché et collé en bonne place, accompagnée des antécédents du patient. Il note aussi les numéros de travail pour les autres échantillons dosés qui ne sont pas analysés par immunofixation car l'identification immunologique n'apporte pas d'information utile dans le cas de prélèvements itératifs sur plusieurs jours.

En revanche, une nouvelle demande de typage de la cryoglobuline peut être tout à fait utile à distance de quelques mois. En effet, une évolution du type de cryoglobuline du type II vers le type III, et inversement, est possible. Le biologiste réalise l'interprétation en intégrant l'ensemble des données cliniques et biologiques disponibles et portées à sa connaissance. Il complète au besoin les informations qui ne sont pas mentionnées sur la fiche en contactant le médecin prescripteur. Le commentaire du biologiste porte sur plusieurs points. En premier lieu l'aspect macroscopique de la cryoglobuline est précisé. En effet, les cryoglobulines se présentent dans 95 % des cas sous forme



d'un cryoprécipité. Plus rarement cependant elles se manifestent par un gel notamment dans le cas des IgM monoclonales. Dans quelques très rares cas leur précipitation se produit sous forme de cristaux pour certaines IgG monoclonales.

L'aspect quantitatif est également signalé (*tableau IV*). Les cryoglobulines dites faibles (concentration inférieure à 0,1g/L) sont souvent de type mixte rencontrées dans 30 à 40 % des hépatites C ou dans les pathologies infectieuses. Les cryoglobulines moyennes ou importantes sont souvent associées aux maladies à composante auto-immune (connectivites et glomérulonéphrites). Les cryoglobulines très importantes sont souvent de type I monoclonal dans le cadre d'hémopathies lymphoïdes (Waldenström, myélome). Les cryoglobulines massives sont aussi de type I (IgM associées à la maladie de Waldenström).

Le second point du commentaire porte sur l'isotypie de la cryoglobuline. La grande majorité des biologistes s'appuie sur les classifications évoquées plus haut (9, 10). La standardisation des commentaires est possible grâce à des textes prêts à l'emploi qui peuvent être prévus dans un thésaurus des textes codés que chaque équipe de biologistes peut créer dans le SGL équipant son laboratoire. Pour cela, une série de tableaux (*voir tableaux IV à X*), regroupés par axe permettent d'homogénéiser les commentaires si nécessaire. Le biologiste saisit ensuite les résultats dans le dossier biologique informatisé en mentionnant en texte libre l'isotypie seulement pour l'échantillon le plus concentré en cryoglobuline. Dans le cas de prélèvements successifs sur plusieurs jours le taux de cryoglobuline obtenu ainsi que le texte libre « voir les résultats de l'immunotypage en date du : JJ/MM/AAAA » sont saisis pour les autres échantillons du même patient.

Après interprétation et saisie des résultats, la fiche de travail est rendue au technicien du poste pour être archivée dans le fichier des IFE. La durée d'archivage de ce document varie entre un et vingt ans selon les équipes du groupe de travail.

## III - Résultats et discussion

Le protocole décrit au fil des paragraphes précédents est schématisé sur la Figure 3 (*voir page 54*). Il applique la majorité des recommandations préconisées dans les articles de référence (2, 3, 10, 11, 13) en précisant plus particulièrement les points sensibles. Les différents points qui ont été discutés au cours de ce travail sont présentés sur le Tableau III (*voir page 49*) avec le niveau de consensus pour chacun d'eux. Le consensus se dégage totalement sur l'impérieuse nécessité de prélever, transporter, laisser coaguler et centrifuger les échantillons de sérum à 37 °C. Nous proposons pour maîtriser l'étape de transport d'utiliser des valisettes pré-réglées à 37 °C. Ces modules de transport disposent d'une alimentation par le secteur électrique et ont une autonomie de stabilité de la température de 1h après le débranchement. Ce délai est suffisant pour un transport interne à l'établissement. De plus, ces valisettes permettent facilement le préchauffage sécurisé du matériel de prélèvement (tubes et aiguilles). Le personnel est formé à leur utilisation. Pour l'étape de cryoinsolubilisation, nous préconisons l'utilisation de tube conique facilitant la lecture, les lavages et l'isolement du culot. Ce tube conique a déjà fait l'objet d'une préconisation (3) mais dans une version « Microtainer ». Le modèle dont nous proposons l'utilisation est transparent et de manipulation plus aisée dans l'environnement classique d'un laboratoire polyvalent. Le principe de mesurer un volume fixe de sérum de 2 ou 10 mL permet une meilleure standardisation du

**Tableau V**

Libellés pour l'axe concernant le type de cryoglobuline.

N°	Libellé	Élément déclenchant
1	de type I monoclonal	1 seul isotype monoclonal (cf tableau VI)
2	de type II a mixte	1 isotype monoclonal associé à 1 ou plusieurs isotypes polyclonaux (cf tableaux VI + VIII)
3	de type II b mixte	1 ou plusieurs isotypes oligoclonaux associés à 1 ou plusieurs isotypes polyclonaux (cf tableaux VI + VIII)
4	de type III mixte	Association de plusieurs isotypes polyclonaux (cf tableau IX)

**Tableau VI**

Libellés pour l'axe monoclonal concernant les cryoglobulines de type I.

Numéro	Libellé	Élément déclenchant
1	d'isotypie IgM, kappa monoclonale	Bande mince IgM, K
2	d'isotypie IgM, lambda monoclonale	Bande mince IgM, L
3	d'isotypie IgG, kappa monoclonale	Bande mince IgG, K
4	d'isotypie IgG, lambda monoclonale	Bande mince IgG, L
5	d'isotypie IgA, kappa monoclonale	Bande mince IgA, K
6	d'isotypie IgA, lambda monoclonale	Bande mince IgA, L
7	d'isotypie kappa monoclonale	Bande mince, K (très rare)
8	d'isotypie lambda monoclonale	Bande mince, L (très rare)



## Détection, caractérisation et interprétation des cryoglobulines, recommandations du groupe de travail « Cryoglobulines » du Collège National de Biochimie des Hôpitaux

Numéro	Libellé	Élément déclenchant
1	d'isotypie IgM, kappa oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgM, K
2	d'isotypie IgM, lambda oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgM, L
3	d'isotypie IgG, kappa oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgG, K
4	d'isotypie IgG, lambda oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgG, L
5	d'isotypie IgA, kappa oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgA, K
6	d'isotypie IgA, lambda oligoclonale	Plusieurs bandes minces IgA, L
7	Libellé libre à décrire en cas d'isotypes différents responsables de l'oligoclonalité	Plusieurs bandes minces d'isotype IgA et ou IgG, et ou IgM, K et ou L

**Tableau VII**

Libellés pour l'axe oligoclonal concernant les cryoglobulines de type II b.

Numéro	Libellé	Élément déclenchant
1	associée à des IgG polyclonales	Zone diffuse d'IgG
2	associée à des IgA polyclonales	Zone diffuse d'IgA
3	associée à des IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgM
4	associée à des IgG et IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgG et d'IgM
5	associée à des IgG et des IgA polyclonales	Zone diffuse d'IgG et d'IgA
6	associée à des IgA et IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgA et d'IgM

**Tableau VIII**

Libellés pour l'axe polyclonal concernant les cryoglobulines de type II a et II b.

Numéro	Libellé	Élément déclenchant
1	d'isotypie IgG polyclonales	Zone diffuse d'IgG
2	d'isotypie IgA polyclonales	Zone diffuse d'IgA
3	d'isotypie IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgM
4	d'isotypie associant IgG et IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgG et d'IgM
5	d'isotypie associant IgG et IgA polyclonales	Zone diffuse d'IgG et d'IgA
6	d'isotypie associant IgA et IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgA et d'IgM
7	d'isotypie associant IgA, IgG et IgM polyclonales	Zone diffuse d'IgA, IgG et d'IgM

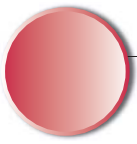
**Tableau IX**

Libellés pour l'axe polyclonal concernant les cryoglobulines de type III.

Numéro	Libellé	Élément déclenchant
1	La concentration très élevée de cryoglobuline et l'isotype IgM doivent faire rechercher des signes d'hyperviscosité (néphropathie, neuropathie...).	IgM > 5 g/L ou signes d'hyperviscosité du sang, néphropathie, neuropathie.
2	La présence d'une cryoglobuline précipitant rapidement a été observée. Ce phénomène peut induire de nombreuses perturbations des dosages biologiques. SVP, pour ce patient, faire parvenir les échantillons de sang à 37°C en signalant ce problème pour une prise en charge optimale.	Perturbation sur la numération, les protéines totales, le phosphore, les dosages des protéines spécifiques du complément et immunoglobulines, les facteurs rhumatoïdes, la sérologie et des techniques d'immunodosages en général.
3	Le taux de cryoglobuline reste stable depuis le précédent examen du jj/mm/aaaa.	Variation < 10 %
4	Le taux de cryoglobuline est en augmentation depuis le précédent examen du jj/mm/aaaa.	Variation > +20 %
5	Le taux de cryoglobuline est en diminution depuis le précédent examen du jj/mm/aaaa.	Variation > -20%

**Tableau X**

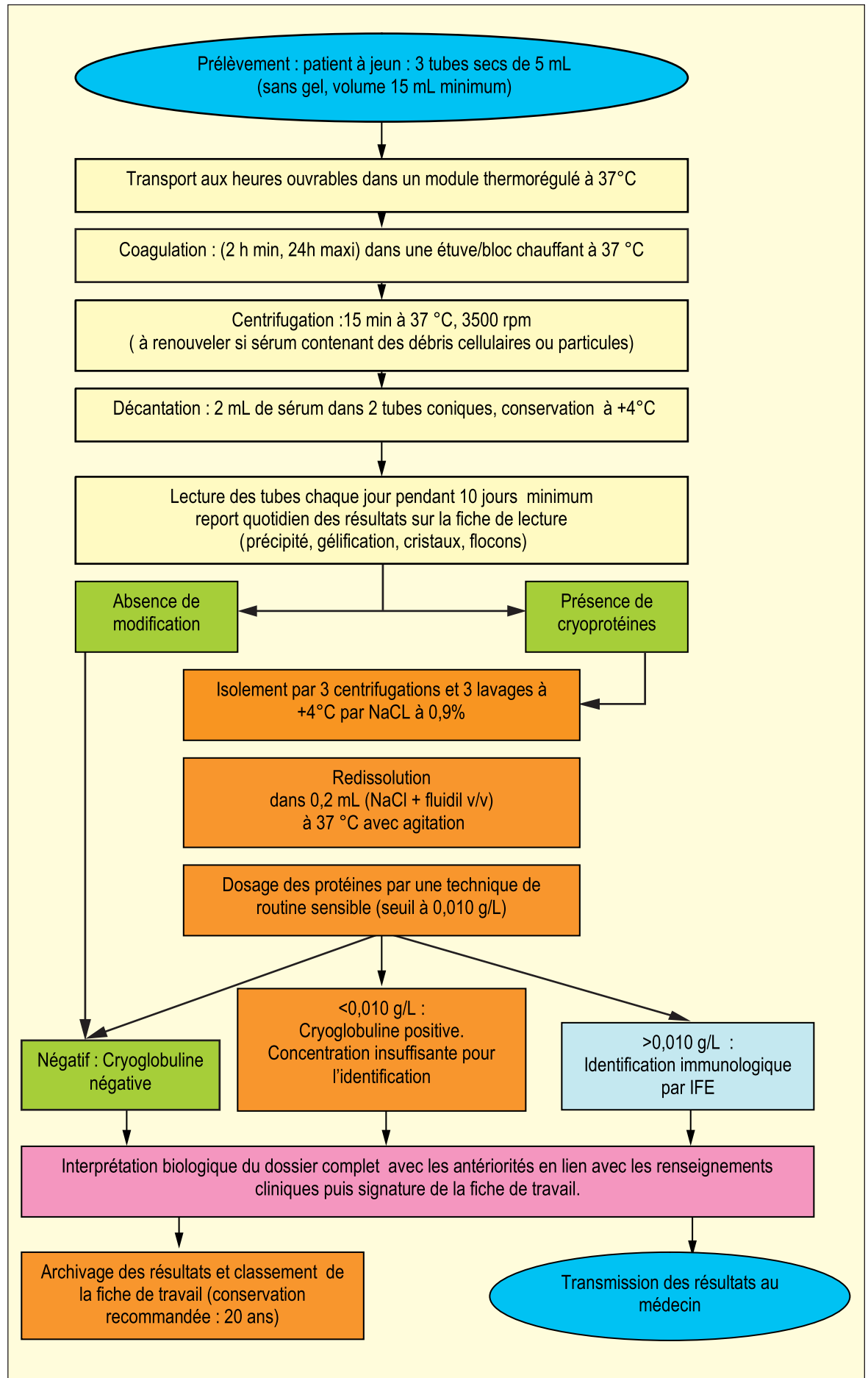
Libellé pour les commentaires autres et l'évolution du taux de cryoglobuline.



# LABORATOIRE PRATIQUE

**Figure 3**

Protocole pour la réalisation et l'interprétation des cryoglobulines.



## Détection, caractérisation et interprétation des cryoglobulines, recommandations du groupe de travail « Cryoglobulines » du Collège National de Biochimie des Hôpitaux

processus de préparation et une bonne sensibilité du dosage du cryoprécipité qui se trouve concentré 10 fois dans notre protocole voire 100 fois dans celui mis en oeuvre par l'équipe Chambérienne.

Le seuil de 0,010 g/L pour déclencher l'immunotypage nous paraît être un bon compromis entre la réalisation systématique de l'immuno-identification, dès lors qu'un dosage se révèle positif, et le seuil de 0,050 g/L qui, bien que retenu par certaines équipes (16), ne nous semble pas assez sensible. Le choix de ce seuil de 0,010 g/L s'est imposé comme celui permettant d'obtenir avec une certitude de plus de 90 % un résultat interprétable par l'IFE. Il nous apparaît en effet regrettable de mettre en oeuvre des techniques relativement coûteuses sans pouvoir engendrer un avantage probant en terme de diagnostic utile au patient (14). Cette attitude, selon nous cohérente, offre la possibilité de procéder à une immunoidentification pour des concentrations inférieures à 0,010 g/L lors d'une demande éventuellement très ciblée du clinicien dans un contexte clinique bien documenté. Par ailleurs, Le seuil proposé est en accord avec les résultats d'un travail récemment publié et montrant qu'une cryoglobuline minime de type III est trouvée chez 53 % des sujets sains de cette étude. Ces cryoglobulines minimales étant a priori dénuées de pathogénicité (4, 17). Quoi qu'il en soit, le groupe de travail n'a pas abouti à un consensus concernant ce point et il apparaît donc utile que des études plus approfondies soient menées par des équipes spécialisées ayant une très forte demande d'analyses de cryoglobulines.

Concernant le test « historique » de thermosolubilité à 37 °C, une propriété observée initialement dans le cas d'un patient porteur d'une importante IgM monoclonale (18), celui-ci nous paraît pouvoir être abandonné. Ce test n'est pas suffisamment sensible pour affirmer la redissolution totale ou partielle du précipité observée dans de nombreux cas. Nous lui préférons l'isolement du cryoprécipité et son dosage. Ce point de vue est partagé par les auteurs d'une publication parue au début de l'année 2005 et résultant d'un travail approfondi et bien documenté (4). L'ajout de fluidil® apparaît également intéressant pour améliorer la resolubilisation de certaines cryoglobulines et augmenter de la sorte le rendement de cette étape dont dépend le résultat de l'IFE. La société Sebia recommande d'ailleurs l'utilisation de ce réactif dépolymérisant lors de la mise en oeuvre de leur technique d'immunofixation si les échantillons se révèlent visqueux ou à même de contenir une cryoglobuline. L'utilisation d'un agitateur vortex constitue également, selon nous, une action supplémentaire très simple pour améliorer la resolubilisation à 37 °C. Toutefois, ce point n'a pas été suffisamment étayé pour faire l'objet d'un accord unanime des membres du groupe de travail.

Enfin, l'utilisation d'une technique sensible de dosage des protéines urinaires automatisée et

accessible en routine au laboratoire nous paraît là encore, être un gage de qualité du résultat. Si l'emploi d'une technique de dosage spécifiquement dédiée aux cryoglobulines s'impose comme une solution idéale pour un grand laboratoire spécialisé dans l'étude des cryoprotéines (4), cette alternative n'est pas pertinente pour un laboratoire de biologie polyvalent. En effet, il apparaît plus fiable d'utiliser un dosage automatique sensible dont les limites sont parfaitement connues plutôt que de développer une technique spécifiquement dédiée à une application dont la fréquence d'utilisation faible ne permettra pas l'acquisition d'un niveau de maîtrise approprié.

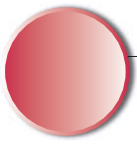
Le dosage différentiel des protéines sériques totales avant et après décantation du cryoprécipité doit être définitivement abandonné car ne présentant selon nous aucune fiabilité (16). La mesure du volume du cryoprécipité ou cryocrite devrait également, sauf cas très rares, être abandonnée. Cette approche conserve une certaine valeur historique, mais ne semble pas apporter d'information utile par rapport au dosage de la cryoglobuline (1). Les cas dans lesquelles cette technique garde un intérêt pour des raisons d'efficacité correspondent au suivi de l'évolution d'un patient sous traitement d'une cryoglobulinémie massive supérieure à 5 g/L (2). Par ailleurs, si la réalisation du cryocrite apparaît simple, celle-ci doit s'effectuer selon un protocole précis garantissant la reproductibilité de la mesure.

On notera que la concentration de la cryoglobuline peut être contrôlée de façon simple par l'expérience, en observant l'intensité de la coloration sur les différentes pistes du gel de l'IFE, en effet, celle-ci est directement proportionnelle au dosage. Ce contrôle semi-quantitatif visuel permet la vérification de cette concordance et doit être intégré à l'étape d'interprétation et de validation des résultats par le biologiste.

Rappelons que le seuil de mise en évidence des immunoglobulines sur l'IFE est situé dans une fourchette de 0,1 à 0,2 g/L. C'est d'ailleurs également pour cette raison que nous préconisons 0,010 g/L comme valeur seuil pour la mise en oeuvre de l'IFE.

Le biologiste doit également vérifier l'absence de trace d'albumine sur le gel d'IFE (16), preuve que le lavage du cryoprécipité a été correctement réalisé et que l'interprétation peut être réalisée sans risque d'interférence liée aux immunoglobulines non cryoprécipitantes.

Si l'on constate une précipitation de la cryoglobuline au point de dépôt, il est nécessaire de procéder à un prétraitement de l'échantillon avant de refaire l'IFE. On ajoutera pour ce faire 20 µL d'une solution de bêta-mercaptoéthanol, un agent de dépolymérisation présentant une forte capacité à réduire (ouvrir) les ponts disulfures.



En ce qui concerne la lecture et l'interprétation des profils immunologiques obtenus par la technique d'IFE, nous avons retenu la table d'items contenus dans la fiche de travail présentée en Figure 2 (voir page 51). Ces items sont classés selon 6 axes : quantitatif, type, monoclonal, oligoclonal, polyclonal, autres et évolution. Cette présentation s'inspire principalement de la classification communément utilisée (10). La formalisation prédéfinie de textes (*tableaux IV à X*) permet une interprétation complète, objective et harmonisée des résultats. Nous recommandons l'utilisation de ce principe qui facilite beaucoup la lecture interprétative de l'IFE et contribue à la standardisation du commentaire généré par les différents biologistes, quel que soit le lieu d'exercice. Une évaluation de cette pratique nous paraît utile à réaliser en collaboration avec les cliniciens. Cette proposition est par ailleurs en conformité avec la démarche d'évaluation des pratiques professionnelles (EPP).

## IV - Conclusion

Cet article et plus globalement l'ensemble des communications (publications, atelier, affiche) produit par les membres du groupe de travail du CNBH a été réalisé de façon à inciter un nombre plus important de laboratoires à prendre en charge cette analyse considérée comme compliquée. Nous nous sommes attachés à donner une description méthodologique très documentée et la plus précise possible afin de faciliter et d'optimiser chacune des étapes nécessaires à sa réalisation. L'appropriation de cette analyse sera significativement facilitée si le laboratoire maîtrise déjà une technique d'identification immunologique des immunoglobulines, suffisamment sensible et reproductible. Cet examen ne bénéficie d'aucune possibilité de contrôle de qualité et la seule garantie de sa qualité se trouve donc intimement liée à une bonne maîtrise technique. L'intérêt clinique associé au résultat de la recherche d'une cryoglobuline, à son dosage et à sa caractérisation rendent, de fait, cette qualité indispensable.

### REMERCIEMENTS

Nous remercions infiniment le docteur Didier Le Carrer pour le partage très confraternel et généreux de son expérience sur cette question et les nombreuses informations qu'il nous a régulièrement communiquées ces dernières années

### BIBLIOGRAPHIE

- (1) AUCOUTURIER P., ALYANAKIAN MA, RICHARD S., MOREAU P., Cryoglobulinémies. *Option Bio*, 2000, sup 243/244, 18-20.
- (2) INTRADOR L., PHAM BN, Cryoglobulines : méthode de détection et interprétation. *Cahier de formation Bioforma*, 2003, 85-103.
- (3) LE CARRER D., Les Cryoglobulinémies : exploration biologique et signification cliniques. *Revue francophone des laboratoires*, 1995, 279, 43-51.
- (4) OLIVER M., COTON T., RAGOT C., CHIANÉA D., MOALIC JL, DEBONNE JM, Cryoglobuline : recherche et quantification. Etude chez le sujet sain et chez des patients atteints d'une hépatite C chronique, *Ann. Biol. Clin.*, 2005, 1, 59-65.
- (5) COPPO P., LASSOUED K., Cryoglobulinémies : diagnostic, étiologie, *Médecine thérapeutique*, 2000, 1, 48-53.
- (6) MORRA E., Cryoglobulinemia. *Hematology* 2005, 368-732.
- (7) GEMIGNANI F., BRINDANI F., ALFIERI S., GIUBERTI T., ALLERGI I., FERRARI C., MARBINI A., Clinical spectrum of cryoglobulinaemic neuropathy, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2005, 76, 1410-1414.
- (8) BROUET JC, Cryoglobulinémie, 2001 In Thérapeutique dermatologique, Louis Dubertret, S. Aractingi, H. Bachelez, C. Bodemer, O. Chosidow, B. Cribier, P. Joly, Ouvrage disponible en ligne [www.therapeutique-dermatologique.org](http://www.therapeutique-dermatologique.org)
- (9) BROUET JC, CLAUVEL JP, DANON F., KLEIN M., SELIGMAON M., Biological and clinical significance of cryoglobulins, *Am. J. Med.*, 1974, 57, 775-788.
- (10) LE CARRER D., Cryoglobulinémies : proposition d'un protocole d'exploration biologique, Actualisation de leur classification, *Les feuillets de biologie*, 1998, 221, 55-65.
- (11) OLIVIER M., COTON T., RAGOT C., DELPY R., MOALIC JL, DEBONNE JM, Les cryoglobulinémie, *Ann. Biol. Clin.*, 2004, 5, 521-528.
- (12) SZYMANOWICZ A., NEYRON MJ, DENIS I., Protocole pratique pour la détection, la caractérisation et l'interprétation des cryoglobulines, *IBS*, 2006, 21, 319-326.
- (13) CACOUB P., LUNEL-FABIANI F., MUSSET L., OPOLON P., PIETTE JC, Hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemias, *N. Engl. J. Med.*, 1993, 328,15, 1121-1124.
- (14) GERRIER P., LECOMTE C., Cryoglobulines : aspects biochimiques, mise en évidence et caractérisation. Cryoglobulines en pratique clinique, mythes et réalités, *Option Bio*, 2005, sup n° 352, 9-10.
- (15) SZYMANOWICZ A., DOCHE C., COULHON H., HENNA-CHE B., COQUELIN H., BERKHANE Z., HESS C., CAILLIEZ M., ONREAD B., Recommandations pour l'isolement, l'identification et l'interprétation des cryoglobulines. 2006, Communication par affiche, 35<sup>e</sup> Colloque national des biologistes des hôpitaux, Saint-Malo.
- (16) LAPLANCHE S., MUSSET L., Recherche et caractérisation des cryoglobulines au laboratoire, *Feuillets de Biologie*, 1992, 188 : 29-33.
- (17) ROMASKO JP, TRIDON A., JOUANEL P., SUBTIL E., DIBET P., BETAÏL G., Détection et analyse des cryoglobulines : étude comparative d'une population de malades et d'une population de témoins sains, *Pathol. Biol.*, 1993, 41 : 525-529.
- (18) WINTROBE JT, BUELL MV, Hyperproteinemia associated with multiple myeloma, with 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.