UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

ISTITUTO DI MEDICINA INTERNA

CATTEDRA DI IMMUNOLOGIA CLINICA

RECENTI ACQUISIZIONI SULLE CRIOGLOBULINEMIE

RELATORE:

Prof. G. S. DEL GIACCO

TESI DI LAUREA
DI
STEFANO SIDDI

ANNO ACCADEMICO 1982 - 83

I N D I C E

RIASSUNTO..... Pag. 1

INTRODUZIONE..... " 2

MATERIALE E METODI..... " 10

RISULTATI..... " 24

DISCUSSIONE..... " 27

TABELLA N° 1..... " 32

TABELLA N° 2..... " 33

TABELLA N° 3..... " 34

TABELLA N° 4..... " 35

TABELLA N° 5..... " 36

TABELLA N° 6..... " 37

TABELLA N° 7..... " 38

FIG. 1..... " 39

FIG. 2..... " 40

BIBLIOGRAFIA..... " 41

RIASSUNTO

Vengono descritti 4 casi di crioglobulinemia con esposizione di dati relativi al quadro clinico e a quello immunologico. Si tratta di un caso di crioglobulinemia di 1° tipo, secondaria a malattia di Waldenström e complicata dall'insorgenza di un carcinoma gastrico, di due casi di crioglobulinemia mista di 2° tipo, di cui uno essenziale e uno secondario a malattia reumatoide ed un caso di crioglobulinemia mista di 3° tipo, secondaria a malattia reumatoide.

Vengono proposte alcune ipotesi attuali sulla patogenesi e sulle possibilità terapeutiche delle crioglobulinemie.

INTRODUZIONE

Il primo caso di crioglobulinemia fu descritto in una paziente affetta da mieloma multiplo, che presentava porpora, epatosplenomegalia e fenomeno di Raynaud.

Successivamente le crioglobuline furono poste in evidenza in corso di malattie linfoproliferative ma soprattutto in frequente associazione con infezioni croniche, malattie del tessuto connettivo e malattie epatiche (Tab. 1).

Sono queste le crioglobulinemie associate o secondarie.

Non sempre la presenza di crioglobuline è indicativa di una malattia di base: talvolta si può essere di fronte ad una casuale positività delle crioglobuline in soggetti del tutto asintomatici.

Molto più frequenti sono i casi di pazienti nei quali, pur essendo presenti le crioglobuline nel siero e una sintomatologia più o meno spiccata, non è possibile associare una delle malattie di cui alla tab. 1.

In questi casi si parla di crioglobulinemie essenziali o idiopatiche.

Per quanto riguarda l'incidenza dei due tipi di crioglobulinemia esistono dei dati diversi a seconda delle statistiche esaminate; in genere hanno una frequenza maggiore le crioglobulinemie secondarie: 65% nella casistica di Dammacco, 72% in quella di Brouet e 52% in quella di Invernizzi, solo nella casistica di Dini la crioglobulinemia essenziale è più frequente (57%).

Le crioglobulinemie, oltre che in essenziali e secondarie, vengono ulteriormente classificate in base alle molecole che le costituiscono:

circa 1/3 di esse è rappresentata da una proteina monoclonale IgG ,IgM o più raramente IgA;
in rari casi anche la proteina di Bence-Iones può comportarsi come crioglobulina.

Negli altri 2/3, le crioglobuline sono rappresentate da due o più classi di immunoglobuline e sono perciò denominate "crioglobulinemie miste".

In accordo a Brouet e coll. (Tab. 2) le crioglobulinemie vengono generalmente classificate, per quanto riguarda le molecole che le costituiscono, in tre tipi:

Tipo I : crioglobulinemie monoclonali IgM o IgG o IgA o proteina di Bence-Jones.

Tipo II: crioglobulinemie miste con componente monoclonale (di classe variabile) ed una policlonale (usualmente IgG).

Tipo III : crioglobulinemie miste policlonali composte da una o più classi di immunoglobuline policlonali o, talora, da proteine non immunoglobuliniche quali lipoproteine.

Nella casistica di Brouet del 1974 che includeva 86 casi, il tipo I e II rappresentavano il 25% ciascuno e il tipo III rappresentava il restante 50%.

Nella casistica di 40 casi presentata da Gorevic nel 1980 il tipo III manteneva il 50% ma il tipo I saliva al 38%.

Infine nella casistica presentata da Invernizzi et al nel 1983 riguardante 79 casi di crioglobulinemia essenziale, il tipo I rappresentava solo il 5%, il tipo II il 42% e il tipo III il 53%.

Da quest'ultima statistica è anche opportuno rilevare dal punto di vista epidemiologico, che il rap-

porto fra maschio e femmina è di 1:2 e che la massima incidenza dei sintomi iniziali si ha fra la terza e la quarta decade di vita.

Il meccanismo di crioprecipitazione è incerto.

Le crioglobulinemie miste possono essere considerate come immunocomplessi insolubili al freddo.

Questi complessi possono attivare il complemento depositandosi nei tessuti dove iniziano la lesione.

La crioprecipitabilità delle immunoglobuline monoclonali è influenzata da vari parametri fisico-chimici quali pH, energia ionica,concentrazione proteica e presenza in basse concentrazioni di urea, questo suggerisce l'intervento, durante la precipitazione a freddo, di forze elettrostatiche e idrofobiche deboli.

Recentemente sono state identificate alcune caratteristiche che distinguono le immunoglobuline che fungo

no da crioglobuline dalle altre, ad esempio anormale labilità dei ponti disolfuro fra le catene durante la riduzione e l'alchilazione e piccole differenze nella composizione aminoacidica.

Inoltre è stato descritto un meccanismo che spiegherebbe la crioprecipitazione tramite l'analisi di variazioni reciproche Ab-Ag dovuto a cambiamenti di conformazione, indotti dal freddo, che permettono legami del frammento Fab dell'immunoglobulina ad un determinante di immunoglobuline dello stesso isotipo, ad esempio al frammento Fc o ad una catena leggera.

Clinicamente la crioglobulinemia si associa spesso ad una sindrome caratterizzata da porpora ricorrente, fenomeno di Raynaud, poliartralgie e nefropatia.

La porpora e il fenomeno di Raynaud hanno un tipico decorso intermittente, dipendente non solo dal

freddo ma anche, forse soprattutto, da eventuali stress fisici.

Altre manifestazioni spesso presenti sono le neuropatie periferiche, le crisi dolorose intestinali dovute a porpora gastrica e a infarti intestinali, l'orticaria e le ulcere agli estremi distali;
si può inoltre evidenziare epatosplenomegalia con lieve compromissione della funzionalità epatica (Tab.3).

Del tutto recentemente sono stati riportati dei casi in cui la crioglobulinemia si associava ad un interessamento del SNC che si esplicava con psicosi, diminuzione della capacità di concentrarsi, amnesie parziali e difficoltà nella loquela.

All'EEG in questi casi veniva evidenziato un quadro con interferenza di fondo fra le onde teta e le onde delta. Il TAC non era significativo.

Dal punto di vista istologico, il dato usuale è rappresentato da una tipica vasculite con infiltrazione linfocitica dei vasi e presenza di immunocomplessi e complemento.

Inoltre, specialmente a livello dei vasi dermici, può essere presente un quadro di necrosi fibrinoide.

MATERIALI E METODI

CASISTICA

I° CASO CLINICO (Tab.4)

P.C. : donna di 60 anni. Esordio nel 1968 con astenia, parestesie alle estremità distali degli arti superiori, fenomeno di Raynaud in associazione con le esposizioni al freddo, febbre e artralgia, con i segni di flogosi, a carico dell'articolazione coxo-femorale.
Il Ratest fu costantemente negativo e fu posta diagnosi clinica di artrite reumatoide sieronegativa per cui la paziente venne trattata dapprima con sali d'oro e, nel 1982, con intervento di artroprotesi totale.
All'inizio del 1983 comparvero artralgia e i segni di flogosi a carico delle articolazioni metacarpo-falangee della mano sinistra e del

polso; all'astenia, al fenomeno di Raynaud, alla febbre e alle parestesie, si aggiunse la presenza di lesioni distrofiche all'arto inferiore sinistro.

Nel luglio 1983 gli esami di laboratorio hanno evidenziato:

VES aumentata (prima ora=93), lieve anemia ipocromica, PCR=I: 640, IgM elevate (415 mg%), crioglobulinemia positiva con criocrito di 0,5%, criofibrinogenemia negativa.

Nel frattempo ha praticato terapia con idrossiclorochina e prednisone.

2° CASO CLINICO (Tab. 5)

P.G. : uomo di 68 anni. Esordio nel 1982 con artralgia accompagnata dai segni di flogosi a carico di tutte le articolazioni delle mani, del ginocchio, del gomito e temporo-mandibolari, astenia marcata, febbre e calo ponderale.

Agli inizi del 1983 episodio broncopolmonitico.

A giugno del 1983 furono riscontrati:

VES aumentata (1^ ora = 94), lieve anemia ipocromica, PCR = 1:320+++, 1:640+--, Ratest = 1:80++ presenza di immunocomplessi circolanti; lieve proteinuria (30mg/dl), crioglobulinemia positiva con criocrito pari a 1%.

Venne posta diagnosi di artrite reumatoide e

instaurata terapia con metilprednisolone e sali d'oro.

3° CASO CLINICO (Tab. 6)

P.M. : uomo di 70 anni. Esordio 4 anni orsono con sintomatologia dolorosa epigastrica, nausea, malessere generale, vomito. Vennero allora evidenziati aumento della VES (1^ ora=40), aumento delle IgM sieriche (2790 mg%) con picco a campanile al tracciato elettroforetico e presenza di banda di IgM monoclonale all'immunoelettroforesi. Al mielogramma infiltrazione diffusa di elementi linfocitari. Crioglobulinemia positiva con criofibrinogenemia negativa. Crioprecipitato: all'IEF presenza di IgMk monoclonali.

Test di Coombs diretto: positivo per il C_3.

Presenza di agglutinine fredde anti 1 1:1024

a +4 °C, 1:64 a 20 °C. Fu fatta diagnosi di malattia di Waldenström e trattato con terapia steroidea.

La sintomatologia suddescritta è persistita più o meno invariata con periodi di remissione alternati a periodi di acuzie per cui nell'ottobre 1983 è stata praticata una gastroscopia che ha permesso di diagnosticare un carcinoma gastrico.

Precedenti radiografie dell'apparato digerente erano sempre risultate negative.

Inoltre nell'ottobre 1983 erano presenti:

VES aumentata (1^ ora oltre 100), grave anemia ipocromica, aumento monoclonale delle IgM sieriche (4350 mg%),PCR =1:160++--, C_3 (25mg%) e C_4 (9 mg%) diminuiti, crioglobulinemia posi

tiva con criocrito pari al 3%, inoltre per la prima volta è comparsa una criofibrinogenemia positiva.

E' da rilevare che, pur avendo sempre praticato terapia steroidea, la crioglobulinemia è rimasta sempre positiva con valori del criocrito abbastanza simili fra loro.

4° CASO CLINICO (Tab. 7)

S.L. : donna di 24 anni. Esordio 4 anni orsono con astenia intensa, porpora e manifestazioni ecchimotiche, artralgie diffuse con flogosi delle articolazioni colpite, fenomeno di Raynaud dopo esposizione al freddo. Ora persiste soprattutto la marcata astenia e la comparsa del fenomeno di Raynaud dopo esposizioni al freddo.

Nel settembre 1983 vennero riscontrati: aumento della VES, C_3 nella norma, C_4 non dosabile, Ratest =1:40+++, crioglobulinemia positiva con criocrito pari a 1%.

All'esame urine si riscontrò una proteinuria di 1,4 g/l e un'ematuria microscopica.

La paziente è stata trattata fino a circa due anni fà con terapia steroidea, ora viene trattata con xantinolo nicotinato.

E' da rilevare che, malgrado la terapia steroidea prima e quella vasodilatatrice poi, la crioglobulinemia è sempre rimasta positiva con valori del criocrito abbastanza simili tra loro.

DETERMINAZIONE DELLE CRIOGLOBULINE E DEL CRIOFIBRINOGENO.

Il prelievo di sangue è stato effettuato in tutti i pazienti a digiuno usando siringhe e provette, in vetro per la ricerca delle crioglobuline e in plastica con il citrato per la ricerca del criofibrinogeno, previamente scaldato a 37°C. Il sangue viene quindi fatto coagulare per due ore a 37°C e, dopo aver utilizzato una piccola quantità di siero per dosare il criocrito tramite apposito capillare, il siero e il plasma vengono incubati a 4°C per 4-5 giorni.

Al termine di questo periodo la presenza di un precipitato fioccoso o gelatinoso è indicativa di crioglobulinemia e/o di criofibrinogenemia.

Per avere la certezza assoluta che trattasi di

vera crioglobulinemia e/o di vera criofibrinogenemia è necessario riporre per un tempo variabile (1-2 ore) le provette a 37°C e notare la dissoluzione del crioprecipitato.

Una volta accertata la presenza di crioglobulinemia, dopo aver fatto sciogliere il precipitato a 37°C, è stata praticata sul siero in toto la ricerca del C_3, del C_4, dell'HBsAg e dell'HBsAb, dei FAN, degli anticorpi anti DNA e Ra test.

Il siero rimasto viene di nuovo incubato a 4°C per 2-4 giorni onde si riformi il crioprecipitato e infine viene centrifugato a 0°C. Sul surnatante così ottenuto si ripetono le ricerche suddette.

Una volta allontanato tutto il surnatante, si riporta a volume, aggiungendo una quantità di tampone fosfato a pH 7,2, pari a quello del siero iniziale.

Il crioprecipitato viene sottoposto a tre successivi lavaggi con PBS a pH 7,2 e quindi fatto sciogliere in termostato a 37°C. Sulla soluzione ottenuta, sempre a 37°C, si esegue la ricerca dell'HBsAg e dell'HBsAb con la tecnica dell'emoaglutinazione passiva, di fattori antinucleo in immunofluorescenza indiretta su sezione di fegato di ratto albino, del Ra test, del C_3 e del C_4 e di anticorpi antiDNA.

Inoltre sempre a 37°C, viene eseguita l'immunoelettroforesi con sieri anti $\gamma, \alpha, \mu, K, \lambda$.

Per quanto riguarda il plasma citrato, in caso di positività per il criofibrinogeno si avrà, come detto, un precipitato facilmente dissolvibile a 37°C, la cui composizione, dopo due lavaggi con citrato freddo e dissoluzione a 37°C, viene confermata tramite immunodiffusione in agar con siero antifibrina.

ALTRE DETERMINAZIONI

HBsAg e Ab: emoagglutinazione passiva (Serodia).

Anticorpi antiDNA nativo: radioimmunoassay (Amersham).

FAN: immunofluorescenza indiretta su sezione di fegato di ratto albino.

C_3 e C_4 immunodiffusione radiale sec. Mancini (Behring).

Ra test: agglutinazione al lattice (Behring).

RISULTATI

I dati immunochimici relativi ai quattro casi di crioglobulinemia esaminati, sono presentati nelle tabelle 4,5,6 e 7, ciascuna relativa ad uno dei casi clinici.

Viene confermata la marcata diminuzione del C_4 sierico, talora sino a valori sotto la soglia di sensibilità per i metodi usati.

Il C_3 sierico rimaneva diminuito in un caso su quattro.

In un caso l'IEF praticata su siero non rileva la componente monoclonale evidenziabile invece con l'IEF su crioprecipitato.

Fra i quattro casi esaminati sono presenti:

- 2 casi di crioglobulinemia mista di tipo II ambedue

con una componente monoclonale IgMk e componente policlonale IgA e/o IgG (tabelle 7 e 4), di cui uno (Tab. 7) essenziale e l'altro secondario ad artrite reumatoide.

- I caso di crioglobulinemia mista di III tipo secondaria ad artrite reumatoide, con tre componenti crioprecipitabili identificate come IgG, IgA, IgM, tutte policlonali (Tab. 5).
- I caso di crioglobulinemia di tipo I associato a malattia di Waldenström, con una componente IgMKm, ha recentemente evidenziato la positivizzazione del criofibrinogeno.

Tale variazione ha accompagnato la modificazione del quadro clinico, complicato dall'insorgenza di un carcinoma gastrico.

La ricerca dell'antigene di superficie dell'epa-

tite B e dell'anticorpo specifico è risultato negativa in tutti i casi, così pure la determinazione degli anticorpi antinucleo e anti DNA doppia elica.

Il reumatest e risultato positivo in due casi (Tabelle 7 e 5) ma solo sul siero in toto e sul surnatante.

DISCUSSIONE

Il quadro clinico dei casi presentati è dominato dai sintomi della malattia di base.

Nell'unico caso di crioglobulinemia essenziale, è presente la triade sintomatologica caratteristica rappresentata dalla artralgia, la porpora e il fenomeno di Raynaud.

Nei due casi secondari ad artrite reumatoide, mentre in uno non è possibile rilevare l'abituale associazione fra segni clinici di vasculite e crioglobulinemia, nell'altro invece sono presenti le parestesie, il fenomeno di Raynaud e le lesioni distrofiche.

Va sottolineato che nel primo caso non è presente intolleranza al freddo, fenomeno d'altronde rilevabile in circa il 50% dei casi di crioglobulinemia.

Più che il quadro clinico può essere indicativo di una crioglobulinemia, il riscontro di valori di C_4 bassi o, addirittura, non dosabili. Tali valori sono stati evidenziati su campioni di siero prelevati e separati a 37°C e non sono quindi degli artefatti dovuti a precipitazione a freddo della proteina in esame; l'improvvisa diminuzione del C_4 quindi, specie se associata a normalità del C_3, rappresenta un indicazione per la ricerca delle crioglobuline.

La composizione del crioprecipitato è variabile; da rilevare la presenza di una forma mista di III tipo con tre componenti policlonali, di cui quella IgM dotata verosimilmente di specificità anti IgG e, forse, anti IgA.

Per quanto riguarda la positività per il criofibrinogeno, questa viene in letteratura associata a qua

dri clinici imponenti di diatesi emorragiche, spesso secondarie a neoplasie soprattutto gastriche, ovariche e prostatiche.

Nel caso n°4, in cui è stata evidenziata criofibrinogenemia, questa è effettivamente comparsa in associazione con un carcinoma gastrico, ma non si è per il momento accompagnata a fenomeni emorragici.

Su tutti i quattro casi esaminati è risultato negativo l'HBsAg; questo dato, contrastante con quanto riportato in letteratura, può essere forse spiegato con la relativa scarsa sensibilità del metodo usato per la determinazione.

Per quanto riguarda il significato patogenetico delle crioglobuline, è ormai accertato che le forme miste rappresentino immunocomplessi circolanti, la cui deposizione a livello dei capillari tissutali porta al

quadro clinico della malattia da immunocomplessi.

Tipicamente artralgia, vasculite con neuropatie periferiche (da vasculite dei vasa nervorum) e interessamento del SNC si associano con le forme miste di II e III tipo.

Le crioglobuline sarebbero degli immunocomplessi insolubili a freddo, dove gli antigeni più frequenti sono rappresentati da IgG autologhe, HBsAg, antigeni nucleari vari.

La terapia deve essere naturalmente diretta alla malattia di base ogni qualvolta questa sia evidenziabile.

Trattamento con sintomatici e l'evitare l'esposizione al freddo sono anche importanti.

Purtroppo non esiste un trattamento d'elezione per le forme essenziali, se si eccettua la plasmafere

si come misura di emergenza in caso di gravi complicanze potenzialmente letali a carico del SNC o del rene.

TAB. 1

Crioglobulinemie: associazioni cliniche (da Invernizzi et al acta haemat. 70:73-82, 1983). Ampliata.

A) MALATTIE MALIGNE LINFOIDI:

macroglobulinemia di Waldenström, mieloma multiplo linfoma non-Hodgkin, leucemia linfocitica cronica.

B) MALATTIE DEL COLLAGENO:

LES, artrite reumatoide, sindrome di Sjögren, sclerosi sistemica progressiva, polimiosite, poliarterite nodosa.

C) MALATTIE INFETTIVE:

a) VIRALI: mononucleosi infettiva, epatite, rosolia etc.

b) BATTERICHE: endocardite batterica subacuta, lebbra, nefrite post streptococcica, ascessi viscerali, tubercolosi polmonare.

c) PARASSITARIE: malaria, schistosomiasi, kala azar.

D) MALATTIE EPATICHE:

epatite cronica attiva, epatite cronica persistente, cirrosi di Morgagni-Laënnec.

E) ALTRE MALATTIE EMATOLOGICHE:

porpora di Schonlein-Henoch, malattie delle agglutinine a freddo.

TAB. 2

Classificazione immunochimica e frequenza sec. Brouet (1974).

TIPO I	- crioglobulina monoclonale	IgM
24,5%	- crioglobuline essenziali	IgG
	- crioglobuline secondarie a mieloma, m. di Waldenström	IgA Bence-Jones
TIPO II	- crioglobulinemia mista con componente monoclonale (mal. immunoproliferative e del connettivo: LES,PAN,etc)	IgM - IgG IgG - IgG IgA - IgG
25,5%	- crioglobulinemie essenziali	
	- crioglobulinemie secondarie	
TIPO III	- crioglobulinemia mista poli clonale (m. del connettivo, infezioni croniche)	IgM - IgG IgM - IgG-IgA
50%	- crioglobulinemie essenziali	

TAB. 3

Frequenza dei vari segni clinici nella crioglobulinemia (da Gorevic et al 1980).

- porpora	100 %
- ulcere arti inferiori	30 %
- fenomeno di Raynaud	25 %
- artralgie	72,5 %
- nefropatie	55 %
- edema	50 %
- ipertensione	45 %
- epatopatie	70 %
- crisi dolorose addominali	20 %
- linfoadenopatie	17,5 %
- sindrome di Sjögren	15 %
- parestesie	12,5 %
- tiroiditi	5 %
- herpes zoster	17,5 %
- polmoniti batteriche	20 %

TAB. 4

P.C.

crioglobulinemia: + criofibrinogenemia: - criocrito=0,5%

	Siero	Surnatante	Crioprecipitato
HBsAg	neg.	neg.	neg.
HBsAb	neg.	neg.	neg.
C_3	IIImg%	103mg%	N.D.
C_4	12mg%	12mg%	N.D.
FAN	neg.	neg.	neg.
Anti DNA	n.d.	38 U/ml	1 U/ml
Ra test	neg.	neg.	neg.
IEF	normocompatibile	n.d.	$IgMk_m$-IgG_p

neg. = negativo
N.D. = non dosabile
n.d. = non determinato
m. = monoclonale
p. = policlonale

TAB. 5

P.G.

crioglobulinemia: + criofibrinogenemia: - criocrito=1%

	Siero	Surnatante	Crioprecitato
HBsAg	neg.	neg.	neg.
HBsAb	neg.	neg.	neg.
C_3	49mg%	56mg%	N.D.
C_4	N.D.	N.D.	N.D.
FAN	neg.	neg.	neg.
Anti DNA	12 U/ml	14 U/ml	0 U/ml
Ra test	1:160++-	1:80++-	neg.
IEF	aumento IgG	n.d.	IgG_p-IgA_p-IgM_p

neg. = negativo
N.D. = non dosabile
n.d. = non determinato
p. = policlonale

TAB. 6

P.M.

crioglobulinemia: + criofibrinogenemia: + criocrito=3%

	Siero	Surnatante	Crioprecipitato
HBsAg	neg.	neg.	neg.
HBsAb	neg.	neg.	neg.
C_3	30mg%	16mg%	N.D.
C_4	11mg%	6mg%	N.D.
FAN	neg.	neg.	neg.
Anti DNA	0 U/ml	0 U/ml	0 U/ml
Ra test	neg.	neg.	neg.
IEF	presenza di banda IgMKm	n.d.	IgMkm

neg. = negativo
N.D. = non dosabile
n.d. = non determinato
m. = monoclonale

TAB. 7

S.L.

crioglobulinemia= + criofibrinogenemia= - criocrito=1%

	Siero	Surnatante	Crioprecipitato
HBsAg	neg.	neg.	neg.
HBsAb	neg.	neg.	neg.
C_3	74mg%	71mg%	N.D.
C_4	N.D.	N.D.	N.D.
FAN	neg.	neg.	neg.
Anti DNA	0 U/ml	0 U/ml	0 U/ml
Ra test	1:40++-	1:40++-	neg.
IEF	presenza di $IgMk_m$	n.d.	$IgMk_m$-IgA_p-IgGk

neg. = negativo
N.D. = non dosabile
n.d. = non determinato
m. = monoclonale
p. = policlonale

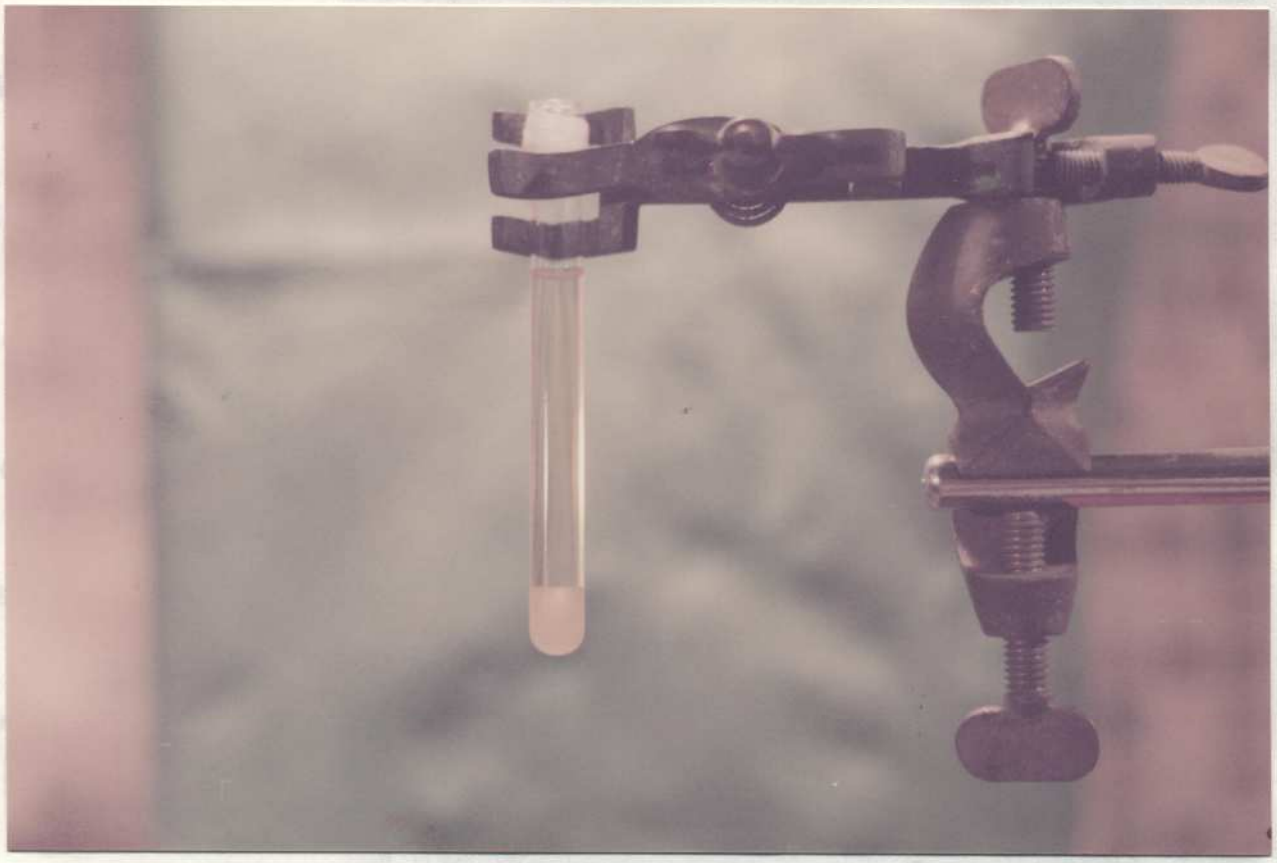

Fig. 1 - Esempio di crioprecipitato.

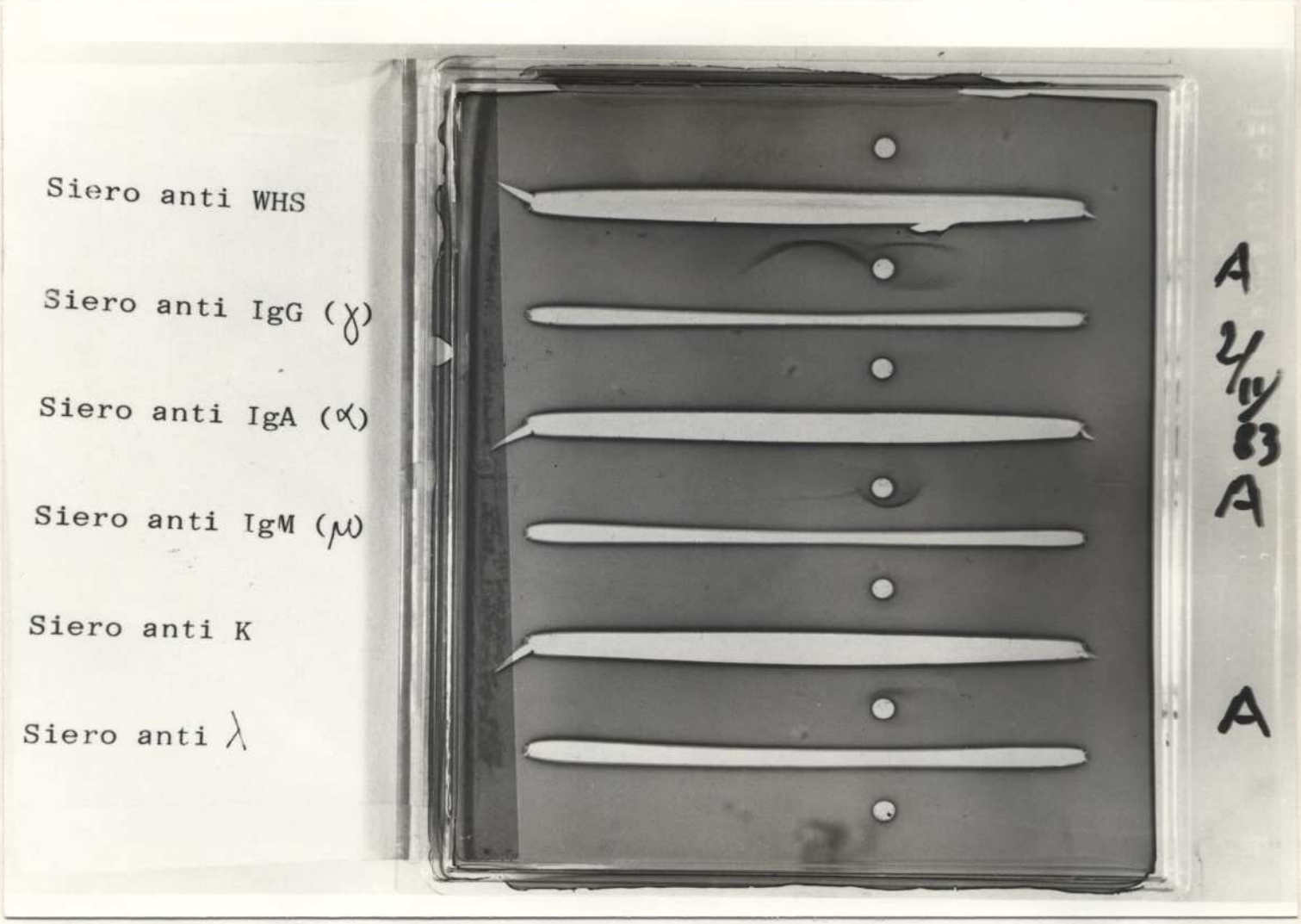

Fig. 2 - IEF su crioprecipitato:
esempio di crioglobulinemia di I tipo.

BIBLIOGRAFIA

1) DAMMACCO F. et al., Ricerca Clin. Lab. 1980 10:51.

2) BROUET J.C. et al., in Chenais, Cryoproteins 1978, pp. 159-170.

3) INVERNIZZI F. et al., acta haemat. 1983, 70:73

4) DINI E. et al., in BONOMO, TURK, Proc. Int. Symp. on Immune Complex Disease 1970, pp. 149-151.

5) BROUET J.C. et al., Am. J. of Med. 1974,57:775

6) GOREVIC P.D. et al., Am. J. of. Med. 1980, 69:287.

7) BLOCK K.J. et al., JAMA 1982, 20:2670.

8) PINES A. et al., Postg. Med. J. 1982,58:359.

9) WINFIELD J.B. et al., Clin. Immunol. and Immunopath. 1982, 23:58.