

کرایوگلوبولینمی در بیماران دیالیزی و پیوند کلیه ای مبتلا به هپاتیت های B و C

دکتر سیروس جداری سیفی: استادیار ویروس شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail: jedaryseifi@yahoo.com

شاهرخ فرشباغ آقائی: کارشناس ارشد میکروبیشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر حسن ارکانی: دانشیار نفرولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر صادق ابراهیم پور مقدس: استادیار ویروس شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۵/۱/۱۹، پذیرش: ۸۵/۴/۱۹

چکیده

زمینه و اهداف: کرایوگلوبولینمی اختلالی است که در دراز مدت در افراد مبتلا به هپاتیت های B و C نیز ممکن است مشاهده شده و اغلب با تولید فاکتور روماتوئیدی باعث مصرف اجزا کمپلمان موجود در سرم میشود. از نقطه نظر اینکه بیماران دیالیزی و پیوند کلیه اغلب به هپاتیت های B و C مبتلا میشوند بنا بر این در این مطالعه میزان فراوانی کرایوگلوبولینمی و فاکتور روماتوئیدی در بیماران فوق مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: در ۲۲۹ بیمار دیالیزی و ۷۰ بیمار پیوند کلیه ای که آنتی ژنهای سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) و آنتی بادی ضد ویروس هپاتیت C در آنها با روش ELISA تأیید شده بود، از هر دو جنس و با طول درمان متفاوت انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های سرمی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد جمع آوری و بمدت یک هفته در یخچال برای رسوب کرایوگلوبولین ها نگهداری شد. همچنین فاکتور روماتوئیدی با روش لاتکس آگلوتیناسیون کمی مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته ها: در بیماران دیالیزی و پیوند کلیه ای میزان کرایوگلوبولینمی به ترتیب ۳۶/۶۸٪ و ۱۵/۷۱٪ و فاکتور روماتوئیدی به ترتیب ۵۳/۵۷٪ و ۲۰٪ بدست آمد. در رابطه با سن و جنس بیماران تأثیر مهمی دیده نشده ولی با طولانی شدن طول مدت دیالیز افزایش چشمگیری در میزان فراوانی کرایوگلوبولینمی و فاکتور روماتوئیدی در بیماران مشاهده شد. شیوع کرایوگلوبولینمی و فاکتور روماتوئیدی در بیماران دیالیزی مبتلا به هپاتیت B به ترتیب ۳۲٪ و ۵۰٪ ولی در بیماران مبتلا به هپاتیت C به ترتیب ۶۰٪ و ۸۰٪ اندازه گیری شد ($p < 0/001$). این مقادیر در بیماران پیوند کلیه به ترتیب ۳۸/۸۸٪ و ۵۰٪ مشاهده شد ($p < 0/001$). شیوع کرایوگلوبولینمی و فاکتور روماتوئیدی در بیماران مونث دیالیزی بیشتر از مردان (۵۳/۲۶٪ در برابر ۲۵/۵۴٪ و ۶۳/۱۳٪ در برابر ۴۵/۹۸٪) بدست آمد که در مورد بیماران پیوندی صدق نمیکند.

نتیجه گیری: عفونتهای مزمن و طولانی مدت با ویروس های هپاتیت B و C در بیماران دیالیزی و پیوند کلیه ای منجر به تشکیل کرایوگلوبولینمی و ظهور فاکتور روماتوئیدی شده که همراه با تخریب بافتی در بیماران می باشد. کنترل و ارزیابی منظم این فاکتورها و درمانهای مناسب در این دوره میتواند باعث سهولت زندگی و طولانی شدن عمر آنها شود.

کلید واژه ها: هپاتیت های B و C، کرایوگلوبولینمی، فاکتور روماتوئیدی، دیالیز و پیوند کلیه

مقدمه

میکروهماتوری و پروتئین اوری میباشد. در بیماریهای مختلف نظیر میلوم مولتیپل، ماکروگلوبولینمی و لمفوما میتوان انواع مختلف کرایوگلوبولین ها را با تظاهرات بالینی مربوطه مشاهده نمود (۱ و ۲). در برخی از بیماریهای ویروسی مثل عفونتهای HCV و HBV نیز انواع مختلط آن را میتوان مشاهده نمود که تشخیص آنها در مواردی نظیر گروههای در معرض خطر برای این هپاتیت ها بیش از روشهای ایمنولوژیک دارای ارزش تشخیص خواهد بود (۱ و ۳). به نظر میرسد که کرایوگلوبولین یکی از عواقب

کرایوگلوبولینها دسته ای از پروتئین های غیر طبیعی با ماهیت آنتی بادیها هستند که در برخی از بیماریهای مزمن کبدی از جمله هپاتیت های B و C دیده میشوند. کرایوگلوبولین ها دارای سه تیپ بوده که تیپ های ۲ و ۳ بیشتر در بیماریهای مزمن کبدی ویرال مشاهده میشود. در بروز این پروتئین ها عوامل متعددی نقش دارند، از جمله عوامل ژنتیک که از فاکتورهای مهم بوده و با افزایش غیر طبیعی تست های کبدی همراه است. کرایوگلوبولین ها عامل آسیب های مختلف مانند هماتوری، مامبرانوپرولیفراتیو، پورپورای هونخ شوئن لاین و نفروپاتی در اشکال مختلف مثل

1. MembranoProGlomeruloNephritis, MPGN
2. Hepatitis C Virus
3. Hepatitis B Virus

مدت بعنوان منفی تلقی شدند. ارزیابی فاکتور روماتوئیدی با روش لاتکس اگلوتیناسیون انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج بدست آمده از نرم افزار SPSS و روشهای Chi-square و Anova استفاده شد.

یافته ها

در این بررسی از ۲۹۹ بیمار مراجعه کننده به بخشهای مختلف دیالیز و پیوند کلیه بیمارستانهای تبریز بدون در نظر گرفتن سن و جنس نمونه برداری بعمل آمده و شیوع هپاتیت های B و C مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله در جدول ۱ نشان داده شده است. از ۲۹۹ بیمار مورد آزمایش تعداد ۹۵ نفر از نظر وجود کرایوگلوبولین مثبت بود که در این میان سهم افراد تحت دیالیز بیش از ۲ برابر افراد پیوند کلیه بود ($p < 0/001$). تست ردیابی فاکتور روماتوئیدی در این بیماران با روش لاتکس اگلوتیناسیون (کیت Omega) انجام، که جمعا در ۱۳۶ نفر از این افراد نتیجه مثبت بدست آمد. سهم افراد دیالیزی در این تست نیز بیش از ۲ برابر افراد پیوندی بود ($p < 0/001$). میزان شیوع کرایوگلوبولین و فاکتور روماتوئیدی در افراد مورد بررسی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. برای مطالعه بیشتر موارد کرایوگلوبولین، فاکتور روماتوئیدی و یافتن نقش عوامل موثر در این بیماریها وضعیت کرایوگلوبولین در گروههای مختلف از نظر ابتلا به هپاتیت های ویروسی مورد بررسی قرار گرفته و با افراد بدون هپاتیت تحت دیالیز و پیوند کلیه مورد مقایسه قرار گرفته است. نتایج بررسی در بیماران دیالیزی در جدول ۳ نشان داده شده است.

همانطوریکه از جدول استنباط میشود در افراد بدون هپاتیت ویروسی میزان کرایوگلوبولین $10/12\%$ ، در افراد با عفونت HBV حدود 32% و در افراد با عفونت HCV حدود 60% میباشد. آزمونهای آماری بین انواع ویروسهای مولد هپاتیت های مزمن و کرایوگلوبولین و فاکتور روماتوئیدی ارتباط معنی داری را نشان میدهد ($p < 0/0001$). از طرف دیگر آنالیز آماری بین دو نوع ویروس هپاتیت B و C و همچنین بین افراد بدون عفونت ویروسی و مبتلایان به این عفونت ها اختلاف معنی داری را نشان میدهد ($p < 0/0001$). بعبارت دیگر کسانی که مبتلا به هپاتیت های ویروسی هستند بیشتر در معرض ابتلا و بروز کرایوگلوبولین هستند. وضعیت فاکتور روماتوئیدی در بیماران دیالیزی از حیث هپاتیت های ویروسی $21/52\%$ ، در افراد مبتلا به HBV در حدود 50% و در افراد مبتلا به HCV در حدود 80% میباشد. بنابراین در بیماران فوق بین بروز فاکتور روماتوئید و ابتلا به هپاتیت های ویروسی نیز رابطه معنی داری وجود دارد و اختلاف بین افراد سالم و مبتلا به عفونتهای ویروسی معنی دار میباشد ($p < 0/0001$). نتایج بررسی شیوع کرایوگلوبولین و فاکتور روماتوئیدی در بیماران پیوندی در جدول ۴ نشان داده شده است.

روماتولوژیک هپاتیت های مزمن B و C باشد که علاوه بر آسیب های کبدی موجب تخریب هر چه بیشتر کلیه شده و لذا در هپاتیت های مزمن آسیب های مختلفی نظیر نفروپاتی ها مانند میکروهماتوری، پروتئین اوری، گلوومرونفریت ممبرانوپرولیفراتیو بیشتر دیده میشود (۴).

بررسی های انجام یافته نشان میدهد که میزان بروز کرایوگلوبولینمی در HBV حدود 5% در حالیکه در HCV بیش از 50% است که میتواند ناشی از عوامل مختلف مانند فاکتورهای محیطی و ژنتیکی باشد بطوریکه شیوع کرایوگلوبولینمی مختلط تیپ II در جمعیت ایتالیا بیش از ژاپن میباشد (۵).

امکان دارد در بررسیهای ایمونولوژیک جهت تشخیص هپاتیت B و C به دلایل مختلف نتایج کاذبی ایجاد شود. استفاده از تستهای جانبی مانند RF (Rheumatoid Factor) و بخصوص کرایوگلوبولین در گروههای High risk میتواند مفید باشد. مطالعه کرایوگلوبولین و سایر تستهای جانبی در بیماران دیالیزی و پیوند کلیه در معرض خطر ابتلا به عفونتهای هپاتیت B و C و مقایسه آن در هر دو عفونت از اهداف عمده این بررسی میباشد.

مواد و روش ها

در این بررسی از ۲۹۹ بیمار دیالیزی و پیوند کلیه ای مراجعه کننده به بخش های دیالیز و پیوند کلیه بیمارستان امام تبریز که وجود آنتی ژن هپاتیت B (HBsAg) و آنتی بادی ضد ویروس هپاتیت C (anti-HCV) در آنها با نسل سوم ELISA تأیید شده بود، نمونه خونی اخذ و از نظر کرایوگلوبولینمی مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد ۲۲۹ نفر مربوط به افراد دیالیزی با محدوده سنی $26/5 \pm 45/5$ سال و 70 نفر مربوط به بیماران پیوند کلیه ای با محدوده سنی 19 ± 39 سال بود.

جمع آوری نمونه های خونی بیماران در دمای $37^{\circ}C$ انجام شد زیرا شرط پذیرش نمونه برای ردیابی کرایوگلوبولین هاست (۶ و ۷). پس از سانتریفوژ بمدت ۵ دقیقه در 2000 RPM و در درجه حرارت مذکور سرم حاصله جمع آوری و برای تشکیل رسوب کرایوگلوبولین مورد مطالعه قرار گرفتند. در صورت ظهور رسوب کرایوگلوبولین در لوله های مخصوص به اندازه ارتفاع رسوب علامت گذاری شده و مجددا آنها در $37^{\circ}C$ درجه بمدت ۱ الی ۱۸ ساعت قرار داده شدند. اگر رسوب بدست آمده مجددا بحالت محلول تغییر نیافت پس از روز پنجم بعنوان نتیجه منفی تلقی شده و از دور خارج شدند. در صورتیکه رسوب بدست آمده در مرحله قبل پس از انکوباسیون در $37^{\circ}C$ بحالت محلول در آمدند مجددا برای تشکیل رسوب در دمای C ۴ درجه قرار داده شده و در صورت تشکیل رسوب بعنوان کرایوگلوبولین مثبت ارزیابی شدند.

رسوب کرایوگلوبولین میتواند در عرض یکساعت شروع به تشکیل نموده ولی ممکن است این روند روزها بطول انجامد. بنابراین نمونه ها بصورت روزانه و حداقل بمدت ۵ روز مورد بررسی قرار گرفته و نمونه های عاری از رسوب در پایان این

جدول ۱: شیوع هپاتیت های B و C در کل بیماران مورد مطالعه.

گروه بیماران	نوع ویروس در بیماران					
	بدون عفونت		HCV		HBV	
	درصد	درصد	درصد	درصد	درصد	جمع
دیالیز	۷۹	۳۴/۴۹	۵۰	۲۱/۸۳	۱۰۰	۲۲۹
پیوند	۴۰	۵۷/۱۴	۱۲	۱۷/۱۴	۱۸	۷۰
جمع	۱۱۹	۳۹/۸۰	۶۲	۲۰/۸۳	۱۱۸	۲۹۹

جدول ۲: شیوع فاکتور روماتوئیدی و کرایوگلوبولینمی در بیماران دیالیزی و پیوندی

گروه بیماران	نتیجه تست فاکتور روماتوئیدی					نتیجه تست ردیابی کرایوگلوبولین ها				
	مثبت	درصد	منفی	درصد	مجموع	مثبت	درصد	منفی	درصد	مجموع
بیماران دیالیزی	۱۲۲	۵۳/۲۷	۱۰۷	۴۶/۷۳	۲۲۹	۸۴	۳۶/۶۸	۱۴۵	۶۳/۳۲	۲۲۹
بیماران پیوندی	۱۴	۲۰	۵۶	۸۰	۷۰	۱۱	۱۵/۷۱	۵۹	۸۴/۲۹	۷۰
مجموع	۱۴۶	۴۵/۴۸	۱۶۳	۵۴/۵۲	۲۹۹	۹۵	۳۱/۸۷	۲۰۴	۶۸/۲۳	۲۹۹

جدول ۳: مقایسه شیوع کرایوگلوبولینمی و فاکتور روماتوئیدی در بیماران دیالیزی

نوع عفونت	نتیجه تست فاکتور روماتوئیدی					نتیجه تست ردیابی کرایوگلوبولین ها				
	مثبت	درصد	منفی	درصد	مجموع	مثبت	درصد	منفی	درصد	مجموع
بدون عفونت ویروسی	۱۷	۲۱/۵۲	۶۲	۷۸/۴۸	۷۹	۸	۱۰/۱۲	۷۱	۸۹/۸۸	۷۹
عفونت با HBV	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰	۵۰	۱۶	۳۲	۳۴	۶۸	۵۰
عفونت با HCV	۸۰	۸۰	۲۰	۲۰	۱۰۰	۶۰	۶۰	۴۰	۴۰	۱۰۰
مجموع	۱۲۲	۵۳/۲۷	۱۰۷	۴۶/۷۳	۲۲۹	۸۴	۳۶/۶۸	۱۴۵	۶۳/۳۲	۲۲۹

جدول ۴: مقایسه شیوع کرایوگلوبولینمی و فاکتور روماتوئیدی در بیماران پیوندی

نوع عفونت	نتیجه تست فاکتور روماتوئیدی					نتیجه تست ردیابی کرایوگلوبولین ها				
	مثبت	درصد	منفی	درصد	مجموع	مثبت	درصد	منفی	درصد	مجموع
بدون عفونت ویروسی	۲	۵	۳۸	۹۵	۴۰	۲	۵	۳۸	۹۵	۴۰
عفونت با HBV	۳	۲۵	۹	۷۵	۱۲	۲	۱۶/۶۶	۱۰	۸۳/۲۴	۱۲
عفونت با HCV	۹	۵۰	۹	۵۰	۱۸	۷	۳۸/۸۸	۱۱	۶۱/۱۲	۱۸
مجموع	۱۴	۲۰	۵۶	۸۰	۷۰	۱۱	۱۵/۷۱	۵۹	۸۴/۲۹	۷۰

بحث

نتایج بررسی از این مطالعه نشان می‌دهد که منشا اصلی کرایوگلوبولینمی در بیماران کلیوی و دیالیزی و یا پیوند کلیه ای ابتلا این افراد به هپاتیت های ویروسی بوده و به عبارت دیگر و همانگونه که در منابع نیز آمده است عفونت با HCV عامل اصلی اتیولوژیک کرایوگلوبولینمی و متعاقباً (MPGN) در اینگونه افراد بوده (۱۱-۸) عوامل دیگری نیز مانند سن و جنس و وجود بعضی از بیماریها در این وضعیت دخالت دارند (۱۲ و ۱۳). در این مطالعه کرایوگلوبولینمی و فاکتور روماتوئیدی در بیماران مبتلا به HCV و به نسبت کمتر در بیماران HBV مشاهده شده است. علت فراوانی بیشتر کرایوگلوبولینمی در HCV احتمالاً بدلیل ماهیت مزمن تر این ویروس است. تحریک طولانی مدت لنفوسیت های B در جهت تولید آنتی بادیهای با خاصیت RF از ویژگیهای HCV است (۱۶-۱۴).

در این بررسی نتایج تست کرایوگلوبولین ها در بیماران پیوندی غیر مبتلا به هپاتیت های ویروسی ۵٪، در افراد HBV مثبت ۱۶/۶۶٪ و در افراد مبتلا به HCV حدود ۳۸/۸۸٪ بدست آمد. آنالیز آماری بین انواع ویروس های مولد هپاتیت عفونی، کرایوگلوبولین و فاکتور روماتوئیدی ارتباط معنی داری را نشان داد بترتیب (p=۰/۰۰۵) و (P < ۰/۰۰۱) و از طرف دیگر بین دو نوع ویروس هپاتیت B و C و همچنین بین افراد بدون عفونت ویروسی و مبتلایان به این عفونتها اختلاف معنی داری بدست آمد. (p=۰/۰۰۵) میزان فاکتور روماتوئیدی در بیماران پیوندی از نظر هپاتیت های ویروسی ۵ درصد، در افراد مبتلا به HBV ۲۵ درصد و در افراد HCV مثبت ۵۰ درصد بدست آمد. بنا براین در بیماران فوق بین بروز فاکتور روماتوئیدی و ابتلا فرد به هپاتیت های ویروسی نیز رابطه وجود دارد و اختلاف بین افراد سالم و مبتلا به عفونتهای ویروسی در بروز این فاکتور معنی دار است که با انجام آزمونهای آماری این اختلاف محرز شده است (P < ۰/۰۰۱).

نتیجه گیری

در افرادی که از نظر HCV مثبت میباشند طیف تظاهرات خارج کبدی بر خلاف تظاهرات کبدی بعلت طولانی بودن عفونت، تیر ویروس و فاکتورهای نظیر کرایوگلوبولین، اتو آنتی بادیها، سندرمهای مختلفی نظیر اتوایمون، لنفوپرولیفراسیون و حتی نوروپاتی در نوع مزمن با درصد بالائی مشاهده شود (۲۲). ممکن است تشخیص و درمان چنین مواردی با توجه به اتیولوژی بیماری گمراه کننده باشد، لذا توصیه میشود بیماران HCV مثبت بصورت طولانی مدت از نظر اتو آنتی بادیها، کرایوگلوبولین و RF بررسی و سندرمهای مربوطه مخصوصاً "لنفوپرولیفراسیون در این بیماران مورد ارزیابی قرار گیرد.

از طرف دیگر در این مطالعه اختلاف معنی داری بین کرایوگلوبولین و RF مشاهده شده و علت این امر احتمالاً به این دلیل است که RF جز لاینفک رسوب گلوبولینی بوده و موارد مغایر با این حالت ممکن است بدلیل پدیده پروزون RF باشد که با تشکیل کرایوگلوبولین ها حالت MPGN ایجاد میشود (۱۷ و ۱۸). مطالعات مختلف انجام شده نشان میدهد که ویروسهای هپاتیت B و C در این امر نقش مهمی دارند (۱۰). بنا براین بروز RF و کاهش درصد اجزا کمپلمان میتواند از شاخص های فرعی در تشخیص عفونتهای احتمالی با HCV و HBV در بیماران کلیوی باشد (۱۹ و ۲۰). به نظر میرسد که افزایش آلودگی با HCV میتواند ناشی از عدم تشخیص صحیح بیماری در مرحله window و یا در نتیجه آلوده شدن دستگاههای دیالیز و غیره باشد (۱۲).

References

1. Ferri C, Zignego AL, Pileri SA. Cryoglobulines (review). *J Clin Pathol*, 2002; **55**: 4 – 13
2. Dammacco F, Sansonno D. Antibodies to hepatitis C virus in essential mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Immunol*, 1992; **87**(3): 352 – 6
3. Sasso EH. The rheumatoid factor response in the etiology of mixed cryoglobulins associated with hepatitis C virus infection. *Ann Med Intern*, 2000; **151** (1): 30 – 40
4. Almirall J, Amengual MJ, Lopez T, Andreu X, Oristrell J, Sala M. Type II essential mixed cryoglobulinemia and renal diseases. *J Nefrologia*, 2002; **22**(6):531 – 9
5. Pozzato G, Burrone O, Baba K, Matsumoto M, Hijiiata M, Ota Y, et al. Ethnic difference in the prevalence of monoclonal B – cell proliferation in patients affected by hepatitis C virus chronic, liver disease. *Hepatology*, 1999; **30**(6): 990 – 4
6. Altenberg L. Measuring the cryocrit in cryoglobulinemia, 2000: 1–10, Available from URL: <http://dynamics.org/cryo/cryocrit.htm>
7. Bloch KJ. Cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *New Eng J Med*, 1992; **327**(21): 1521 – 22.
8. Leone N, Pellicano R, Maiocco I, Modena V, Marietti G, Rizzetto M, et al. Mixed cryoglobulinaemia and chronic hepatitis C virus infection: The rheumatic manifestations. *J Med Virol*. 2002; **66**(2): 200 -3
9. Mazzaro C, Pozzato G, Zorat F, Panarello G, Silvestri F, Barillari G, et al. Cryoglobulinaemic membranoproliferative glomerulonephritis and hepatitis C virus infection. *Italian J Gastroenterol & Hepatol*. 1999; **31**(1): 45 – 53
10. Kiyomoto H, Hitomi H, Hosotani Y, Hashimoto M, Uchida K, Kurokouchi K, et al. The effect of combination therapy with interferon and cryofiltration on mesangial proliferative glomerulonephritis, originating from mixed cryoglobulinemia in chronic hepatitis C virus infection. *Therapeutic Apheresis*, 1999; **3**(4):329–33
11. Ferri C, Monti M, La Civita L, Longombardo G, Greco F, Pasero G, et al. Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed type cryoglobulinemia. *Blood*. 1993; **82**(12): 3701 – 4
12. Chiavette JA, Escobar M, Newman A, He Y, Driezen P, Deek S, et al. Incidence and estimated rates of residual risk for HIV, hepatitis C, hepatitis B and human T – cell lymphotropic viruses in blood donors in Canada, 1990 -2000. *Vana Med Ass J*, 2003; **169**(8): 767 – 73
13. D'Amico F, Sansonno D, Piccoli C, Tucci FA, Racanelli V. The cryoglobulines: an overview. *Eur J Clin Invest*, 2001; **31**(7): 628 – 38
14. Cacoub P, Hausfatar P, Musset L, Peitte JC. Mixed cryoglobulinemia in hepatitis C patients. *Ann Med Intern*, 2000; **151**(1) : 20 – 9
15. El – Awady MK, Ismail SM, El – Sagheer M, Sabour YA, Amr KS, Zaki EA, Assay for hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells enhances sensitivity of diagnosis and monitoring of HCV – associated hepatitis. *Clin Chim Acta*, 1999; **283**(2):1 – 14
16. Dammacco F, Sansonno O, Piccoli C, Tucei FA, Racanelli V. The cryoglobulines :An overview. *Eur J Clin Invest*, 2001; **31**(7):628 - 38
17. Bichard P, Ounanian A, Girard M. High prevalence of hepatitis C virus RNA in the supernatant and the cryoprecipitate of patients with essential and secondary type II mixed cryoglobulinemia. *J Hepatology*, 1994; **21**: 58 – 63
18. Bobrovnik SA. The problem of prozone in serum antibody titration and its mathematical interpretation. *UKr Biokhim Zh*, 2003; **75**(2): 113–8
19. Corvetta A, Marchegiani G, Salvi A, Chirelli PA, Danieli G. Immune complexes and complement

- profile in essential mixed cryoglobulinemia before after plasma exchange. *Int J Artif Organs*, 1983; **6** Suppl, 1 : 65 – 8
20. Gebo KA, Chander G, Jenckes MW, Ghanem KG, Herlong HF, Torbenson MS, et al : Screening tests for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C . A systematic review . *J Hepatol*, 2002; **36** :S84 – 92
21. Valentini G, Mantelli A, Persico M, Tuccillo C, Morisco F, Improta RD, et al : Serological and clinical markers of autoimmune disease in HCV – infected subjects with different disease conditions. *Clin Experiment Rheumatol*, 1999; **17**(1) :75 – 9
22. Fremeaux – Bacchi V, Dragon – Durey MA, Blouin J, Mouthon L, Fridman WH . Investigation of the complement system in clinical practice . *Ann Med Intern*, 2003; **154** (8) : 529 – 40