



TERAPIA DELLA GLOMERULONEFRITE SECONDARIA A CRIOGLOBULINEMIA HCV-CORRELATA

S. Laurino¹, S. Borrelli¹, F. Catapano¹, S. Mascia¹, P. D'Angiò¹, M. Calabria¹, M. Grimaldi¹, A. Salvio², R. Minutolo¹, L. De Nicola¹, G. Conte¹

¹Cattedra di Nefrologia, Seconda Università degli Studi, Napoli

²Dipartimento di Medicina Interna P.O.S.M.d.P. Incurabili, Napoli

Treatment of HCV-associated cryoglobulinemic glomerulonephritis

HCV-related membranoproliferative glomerulonephritis is the most common cause of hepatitis C-associated renal disease. Its treatment is still under debate and based on scant experimental evidence. The recommended therapeutic strategy depends on the severity of the kidney disease.

The first-line treatment for patients with mild to moderate clinical and histological kidney damage is antiviral therapy with pegylated interferon alpha and ribavirin for 48 weeks combined with symptomatic treatment (diuretics, angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers). In case of severe renal involvement (nephrotic syndrome, nephritic syndrome and/or progressive renal failure, high activity score of glomerulonephritis on light microscopy), the initial treatment may consist of sequential administration of immunosuppressive therapies (plasmapheresis, corticosteroids and cyclophosphamide) and antiviral agents, although no definitive data are yet available from the literature. B-cell depleting agents such as rituximab may be an alternative to conventional therapy in refractory or intolerant patients. Large randomized and controlled clinical trials are needed to establish guidelines for the treatment of HCV-related cryoglobulinemic glomerulonephritis. (G Ital Nefrol 2009; 26: 318-27)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Cryoglobulinemia, Membrano-proliferative glomerulonephritis, Antiviral agents, Immunosuppressive drugs, Rituximab

PAROLE CHIAVE:

Crioglobulinemia, Glomerulonefrite Membrano-proliferativa, Antivirali, Immunosoppressori, Rituximab

✉ Indirizzo degli Autori:

Dr.ssa Simona Laurino
Scuola di Specializzazione
in Nefrologia
Seconda Università degli Studi
Via M. Longo, 50
80138 Napoli
e-mail: simonalaurino@yahoo.it;
giuseppe.conte@unina2.it

INTRODUZIONE

L'infezione da HCV è una causa frequente di epatopatia cronica nel mondo occidentale. Si stima infatti che circa 170 milioni di persone nel mondo siano infette dal virus dell'epatite C, con una prevalenza dell'1% nell'Europa Occidentale, che raggiunge il 3% in alcune aree del Mediterraneo (1). L'infezione da HCV si associa frequentemente a manifestazioni extra-epatiche tra cui le più importanti sono la crioglobulinemia mista (CM), le glomerulonefriti e i disordini linfo-proliferativi (2). La crioglobulinemia è definita come la presenza di Immunoglobuline circolanti (Ig) che precipitano a freddo e tornano solubili dopo il riscaldamento. Sulla base della composizione del crioprecipitato si distinguono tre tipi sierologici di crioglobulinemia: monoclonale, composta da singole Ig monoclonali (tipo I); mista, comprendente IgG policlonali e IgM monoclo-

nali (tipo II) o policlonali (tipo III) con attività di fattore reumatoide. La crioglobulinemia mista di tipo II, definita anche essenziale, è quella che più frequentemente si associa all'infezione da HCV ed è riscontrabile fino nel 50% dei soggetti infetti da virus dell'epatite C. La maggior parte di questi pazienti è asintomatica; infatti una sindrome crioglobulinemica si osserva in meno del 10% dei casi (3). La sindrome crioglobulinemica si caratterizza per la classica triade: porpora, astenia ed artralgie, e per il coinvolgimento di più organi ed apparati quali fegato (epatosplenomegalia), cute (ulcere), sistema nervoso (neuropatia periferica), rene (sindrome nefritica, sindrome nefrosica, insufficienza renale) e meno frequentemente tessuto linfoide (linfomi non Hodgkin) (4). L'interessamento renale è frequente nella CM, ma in molti casi esso viene diagnosticato molti anni dopo il riscontro di positività per HCV.

Diversi tipi di glomerulonefrite (GN) si associano all'infezione da HCV: la più frequente è la glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP) crioglobulinemica (1, 5). Meno comunemente si possono riscontrare: GNMP senza crioglobulinemia (6), glomerulonefrite membranosa (GNM) (6), glomerulosclerosi focale e segmentale (GSFS) (7) e glomerulonefrite mesangioproliferativa (1, 8). Più dell'80% dei pazienti con CM presenta anticorpi anti-HCV (9) ed inoltre è stata dimostrata un'associazione tra la presenza di crioglobulinemia e lo sviluppo di GNMP nei pazienti HCV positivi (10). Il ruolo cruciale del virus C nella patogenesi del danno renale è stato confermato dalla presenza all'immunostochimica di antigeni virali lungo le pareti dei capillari glomerulari ed a livello del mesangio in pazienti affetti da crioglobulinemia mista HCV-correlata (11).

QUADRO CLINICO E ISTOLOGICO DELLA GLOMERULONEFRITE MEMBRANOPROLIFERATIVA

La GN crioglobulinemica è una forma di GNMP secondaria a deposizione in sede sub-endoteliale di immunocomplessi (IC) comprendenti crioglobuline ed antigeni virali. Essa presenta caratteristiche distintive rispetto alla forma idiopatica:

1) una più spiccata proliferazione endocapillare costituita da infiltrati leucocitari, prevalentemente monocitari;

2) pseudotrombi endoluminali (costituiti dai depositi subendoteliali PAS positivi di crioglobuline che occludono il lume capillare);

3) un aspetto a doppio contorno della membrana basale glomerulare più marcato che nella forma primitiva;

4) una vasculite dei piccoli e medi vasi renali presente in 1/3 dei casi, caratterizzata da necrosi fibrinoide della parete arteriolare con infiltrato linfocitario perivascolare.

L'immunofluorescenza si caratterizza per la presenza di depositi subendoteliali di IgM, IgG, C3 e C4.

Clinicamente la GN crioglobulinemica può presentarsi con anomalie urinarie (proteinuria ed ematuria microscopica) talvolta con insufficienza renale di grado lieve (34%), sindrome nefrosica franca (20%) o sindrome nefritica acuta con rapido deterioramento della funzione renale (25%) (5, 12).

Il 50% dei pazienti presenta insufficienza renale moderata, mentre l'ipertensione, spesso di grado severo, si manifesta nell'80% dei casi, predisponendo i pazienti ad eventi cardiovascolari e cerebrovascolari (5). Tra i parametri di laboratorio tipica è la presenza di crioglobuline per lo più di tipo II, bassi livelli di C4 e, in misura minore, di C3.

TEST DI VERIFICA

1) Qual è il tipo di glomerulonefrite più frequente nei pazienti con infezione cronica da HCV?

- GN membranosa
- GN membrano-proliferativa
- GN mesangio-proliferativa
- GSFS
- GN a lesioni minime.

2) Qual è la prevalenza della crioglobulinemia mista essenziale nei pazienti con infezione da HCV?

- 10%
- 30%
- 50%
- 90%
- 100%.

3) Quali sono le alterazioni istologiche caratteristiche della GNMP secondaria a crioglobulinemia?

- Pseudotrombi endoluminali
- Spiccata infiltrazione endocapillare prevalentemente monocitaria
- Marcato aspetto a doppio contorno della membrana basale glomerulare
- Nessuna delle precedenti
- Tutte le precedenti.

TERAPIA

La presenza di insufficienza renale peggiora la prognosi dei pazienti con crioglobulinemia, non tanto per il rischio di ESRD, che si verifica solo nel 10% dei casi, quanto per la più alta incidenza di eventi cardiovascolari ed infettivi (1, 12). Pertanto è necessario instaurare in questi pazienti una adeguata e precoce terapia.

Poiché nella patogenesi della CM e della GNMP crioglobulinemica sono coinvolti tre meccanismi principali (infezione cronica da HCV, vasculite mediata da IC e proliferazione dei linfociti B), la terapia può articularsi in più livelli:

- 1) terapia antivirale;
- 2) terapia immunosoppressiva standard (ciclofosfamide e steroidi);
- 3) farmaci biologici (anticorpi monoclonali anti-CD20).

1) Terapia antivirale

Il razionale della terapia antivirale si fonda sulla possibilità di ottenere, con l'eliminazione dell'agente scatenante la glomerulonefrite, una risoluzione del danno renale.

Essa si basa sull'uso dell'interferone α (IFN α) o del

suo analogo peghilato (Peg-IFN α), da soli o in associazione alla ribavirina.

Nell'unico ampio studio randomizzato sul ruolo della terapia antivirale nella crioglobulinemia HCV-correlata (13) si osservava una risposta virologica (negativizzazione o riduzione della viremia) nell'80% dei pazienti randomizzati a ricevere monoterapia con IFN α . Tale risposta si associava ad una riduzione significativa della creatininemia e del criocrito che non era presente nei non *responders* e nel gruppo randomizzato a ricevere terapia convenzionale (diuretici, antiipertensivi, steroidi a basso dosaggio).

Tale studio tuttavia non consentiva di trarre conclusioni riguardo l'*outcome* renale, in quanto il coinvolgimento renale, seppur presente nei 2/3 dei pazienti, era lieve (creatininemia media 1.2 mg/dL; proteinuria/creatininuria 0.24) e non accompagnato da alcuna evidenza istopatologica di GNMP (nessun paziente era stato sottoposto a biopsia renale).

Successivamente, Johnson et al. (8) riportava i risultati di uno studio prospettico, in cui 14 pazienti affetti da GNMP HCV-correlata con o senza crioglobulinemia, venivano trattati con IFN α per 6-12 mesi. Degli 11 pazienti nei quali veniva controllata la viremia, 6 presentavano una risposta virologica completa, a cui corrispondeva una significativa riduzione della proteinuria (6.1 ± 4.6 al basale vs 1.3 ± 1.5 g/die al termine della terapia; $P < 0.02$), che non si verificava nei pazienti non *responders* (6.1 ± 3.3 vs 4.2 ± 4.2 g/die P ns). Non si osservava al contrario nessun miglioramento della funzione renale.

In entrambi gli studi riportati, la sospensione della terapia con IFN α era seguita dalla ricomparsa della viremia con *relapse* della sindrome crioglobulinemica.

Sulla base di questi primi studi si può ipotizzare che il raggiungimento di una buona risposta antivirale possa verosimilmente accompagnarsi ad un miglioramento degli *outcomes* renali.

L'introduzione della terapia di associazione con IFN α e ribavirina ha fornito migliori risultati rispetto alla monoterapia, aumentando la percentuale di risposta virologica sostenuta (assenza di HCV RNA nel siero dopo almeno 6 mesi dal termine della terapia) dal 20% della monoterapia (14) al 40-45% della terapia di associazione (15, 16).

Recentemente l'analogo peghilato dell'IFN α , Peg-IFN α , ha dimostrato, grazie al suo miglior profilo farmacocinetico (più lunga emivita, somministrazione monosettimanale), una migliore efficacia in termini di risposta virologica sostenuta (17). Pertanto tale terapia di associazione costituisce oggi il *golden standard* per il trattamento dell'infezione da HCV e alcuni *trials* sembrano suggerirne l'efficacia nella GN crioglobulinemica HCV-correlata. Dati sulla terapia con Peg IFN α + RIBA in pazienti con vasculite crioglobulinemica HCV-

correlata mostrano il raggiungimento di una *clearance* virale sostenuta fino al 55% dei pazienti con una risposta clinica completa della vasculite fino al 77% dei pazienti (18).

Bruchfeld et al. (19) riportavano i risultati della terapia antivirale in 7 pazienti con GN HCV-correlata (5 GNMP, 1GSFS, 1GN necrotizzante) ed IRC (eGFR 10-65 mL/min), trattati con IFN α +ribavirina (n=4), Peg-IFN α + ribavirina (n=2) o ribavirina in monoterapia (n=1). Una risposta virologica sostenuta veniva osservata in 5 pazienti (71%), con una remissione completa della proteinuria (Uprot < 0.5 g/die) in 6, parziale (Uprot da 10 a 4.6 g/die) in 1. Analogamente, in uno studio prospettico non randomizzato (20) su 25 pazienti con glomerulopatia HCV-correlata (22 GNMP crioglobulinemica, 3 GN mesangioproliferativa), affetti da proteinuria nefrosica e IRC di grado lieve-moderato, la somministrazione di IFN α + ribavirina (n=14) o PEG-IFN α + ribavirina (n=4) per una durata media di 18 mesi, risultava in una risposta virologica sostenuta (RVS) nel 67% dei pazienti ed in una riduzione significativa della proteinuria (Uprot basale 2.85 ± 2.2 g/die vs 0.4 ± 0.8 g/die al termine del *follow-up*; $P < 0.05$). Inoltre, nei pazienti con RVS la proteinuria era significativamente ridotta rispetto ai pazienti non *responders* ed al gruppo controllo. In questi 2 studi la risposta virologica sembrava quindi associarsi a quella renale. Al contrario, in uno studio prospettico non controllato di Sabry et al. (21), pur in presenza di una risposta virologica solo nel 25% dei pazienti (5/20), proteinuria, albuminemia e livelli di C3 e C4 miglioravano significativamente in tutti.

La mancanza di randomizzazione, l'esiguità del campione, l'eterogeneità del trattamento antivirale utilizzato, per quanto riguarda il tipo (IFN α standard o peghilato), la durata e la dose, costituiscono importanti limitazioni agli studi sopramenzionati. Pertanto, in mancanza di ampi studi clinici controllati e randomizzati, non è possibile giungere a conclusioni definitive sul ruolo della terapia antivirale nel modificare l'*outcome* renale dei pazienti affetti da GN crioglobulinemica secondaria ad infezione da HCV.

Il regime terapeutico attualmente raccomandato nel trattamento dell'epatite cronica C si basa su iniezioni sottocutanee monosettimanali di Peg IFN α -2a o 2b e una dose orale giornaliera di ribavirina suddivisa in due somministrazioni. La durata della terapia e la dose ottimale di ribavirina variano a seconda del genotipo virale. In presenza di coinvolgimento renale la durata raccomandata della terapia antivirale è di 48 settimane, indipendentemente dal genotipo virale. La *clearance* della ribavirina risulta ridotta nei pazienti con alterata funzionalità renale, pertanto pazienti con *clearance* della creatinina (CLcrea) < 50 mL/min non devono essere trattati con ribavirina. Un aggiustamen-

TABELLA I - TERAPIA ANTIVIRALE NEI PAZIENTI CON IRC

Clearance della creatinina	Dosaggio Peginterferon α	Dosaggio Ribavirina
>50 mL/min/1.73m ²	α -2a, 180 μ g a settimana	<u>Genotipo 1:</u> 1000 mg/die (<75 kg di p.c.) oppure 1200 mg/die (>75 kg di p.c.)
		<u>Genotipo 2:</u> 800 mg/die
<50 mL/min/1.73m ²	α -2a 180 μ g a settimana	Non indicata
DIALISI	Peginterferon α -2a, 135 μ g a settimana	Non indicata

to del dosaggio nei pazienti con insufficienza renale cronica è richiesto anche per la terapia con Peg-IFN α , a causa della sua lunga emivita. L'insufficienza renale è associata ad una lieve diminuzione della clearance del farmaco e ad un prolungamento della sua emivita (Tab. I).

I principali fattori predittivi di una mancata risposta alla terapia sono una viremia basale elevata (HCV RNA >2 milioni di copie/mL), la persistenza di viremia dopo 4-12 settimane dall'inizio del trattamento e il genotipo virale 1b.

EFFETTI COLLATERALI E CONTROINDICAZIONI DELLA TERAPIA ANTIVIRALE

Effetti collaterali vengono osservati in quasi l'80% dei pazienti che ricevono la terapia d'associazione e spesso condizionano le dosi e la durata del trattamento, riducendo la probabilità di una risposta clinica e virologica (Tab. II). L'anemia emolitica indotta dalla ribavirina è la principale causa di riduzione della dose, ma risulta facilmente gestibile con l'uso di supplementi di ferro ed eritropoietina. La comparsa improvvisa di anemia può indurre infarto del miocardio in soggetti con preesistente coronaropatia o *stroke* in quelli con malattia cerebrovascolare.

Controindicazioni alla terapia, legate al potenziale incremento degli effetti collaterali, includono: cirrosi epatica scompensata, malattia psichiatrica, malattia cardiovascolare severa, anemia severa, leuco-piastriopenia.

TEST DI VERIFICA

4) Qual è la causa più frequente di mortalità e morbilità nei pazienti con glomerulonefrite crioglobulinemica?

- Emodialisi
- Neoplasie
- Malattie cardiovascolari
- Infezioni
- c + d.

5) Qual è il più frequente effetto collaterale indotto dalla ribavirina?

- Anemia emolitica
- Febbre
- Astenia
- Artralgie
- Rash.

6) Qual è lo schema terapeutico raccomandato per la terapia antivirale d'associazione (interferone e ribavirina) nei pazienti con CLcrea <50 mL/min e glomerulopatia HCV-correlata?

- Peginterferon alfa-2a 180 μ g a settimana + ribavirina 1000-1200 mg/die per 48 settimane
- Peginterferon alfa-2a 180 μ g a settimana in monoterapia per 48 settimane
- Peginterferon alfa-2a 135 μ g a settimana in monoterapia per 24 settimane
- Peginterferon alfa-2a 135 μ g a settimana + ribavirina 800 mg/die per 24 settimane
- Nessuna delle precedenti.

2) Terapia immunosoppressiva standard

Pur essendo considerato il trattamento di prima linea per la GN HCV-correlata, la terapia antivirale non consente una eradicazione completa della viremia (non più del 50% dei casi) e si associa a frequenti ricadute sia virologiche che cliniche dopo la sua sospensione (12, 13). Inoltre, diversi studi hanno mostrato che l'IFN α non è utile durante la fase acuta di un coinvolgimento renale severo (sindrome nefrosica ingravescente, sindrome nefritica con rapido deterioramento della funzione renale), in quanto pur riducendo la viremia e i livelli di crioglobuline, non consente di bloccare il processo infiammatorio immuno-mediato dovuto alla deposizione di crioglobuline a livello della membrana basale glomerulare e del mesangio e di conseguenza non è in grado di prevenire la progressione del danno renale (22). Peraltro, a causa del suo effetto immunomodulante, l'IFN α può in alcuni casi addirittura peggiorare le manifestazioni vasculitiche e le fasi di acuzie della malattia renale (23-25).

Pertanto un ruolo cruciale può essere svolto dalla

TABELLA II - PRINCIPALI EFFETTI COLLATERALI DEL PEGINTERFERON α E RIBAVIRINA

Frequenza	Effetti collaterali
Molto comuni (>10%)	<i>Flu-like</i> sindrome (cefalea, stanchezza, febbre, mialgia, artralgie), nausea/vomito, alopecia, reazione nel sito d'iniezione, neutropenia, ansia/irritabilità, insonnia, depressione, inappetenza, diarrea, vertigini, dermatite, dolori addominali, prurito*, anemia*
Poco comuni (1-10%)	Ansia e depressione gravi, difficoltà di concentrazione, riduzione della memoria, rash, iper- ipotiroidismo, perdita di peso, trombocitopenia, linfopenia, tosse*, infezioni batteriche, induzione o slatentizzazione di autoimmunità
Rari (<1%)	Psicosi acuta, attacchi di panico, tentativi di suicidio, emorragie retiniche, retinopatia, neuropatia periferica, convulsioni, confusione, coma, pancreatite, ulcera peptica, colangite, insufficienza renale, cardiaca o polmonare, anafilassi, angioedema, infarto del miocardio, angina pectoris, <i>stroke</i> , peggioramento dell'epatite

*Effetti collaterali dovuti prevalentemente alla terapia con ribavirina

terapia immunosoppressiva classica: gli steroidi riducono l'infiammazione e l'infiltrazione leucocitaria del glomerulo, la ciclofosfamide inibisce la proliferazione dei linfociti B e la produzione di crioglobuline. Infine, nei casi più gravi, la plasmaferesi rimuove le crioglobuline circolanti, riducendo la deposizione di IC al livello renale.

Anche riguardo alla terapia immunosoppressiva i dati riportati in letteratura provengono da pochi studi retrospettivi su un numero ristretto di pazienti e *case reports* (5, 26-31).

Tali studi sembrano dimostrare che gli immunosoppressori sono in grado di controllare la fase acuta della malattia, seppur con il rischio di un incremento della replicazione virale.

Tuttavia, non è mai stata riportata in letteratura alcuna evidenza di un danno epatico acuto conseguente a terapie di breve termine con cortisonici e/o farmaci citotossici (27, 28).

Uno studio retrospettivo di Komatsuda et al. (28) condotto su 19 pazienti con GN HCV-correlata (12 con GN mesangioproliferativa, 6 con GNMP, 1 con GNM) si proponeva di valutare il ruolo degli steroidi come terapia di seconda linea per i pazienti resistenti o con controindicazione all'IFN α . Cinque pazienti con interessamento renale lieve-moderato venivano selezionati a ricevere IFN α (600 MU/die) (Gruppo I); 11 pazienti con più marcato coinvolgimento renale (*creascent* alla biopsia renale e/o quadro clinico di S. nefrosica), ricevevano invece prednisolone alla dose di 40 mg/die per 4 settimane (Gruppo II); i rimanenti 3 pazienti venivano trattati con soli antiaggreganti e costituivano il gruppo controllo (Gruppo III). Non si osservava alcuna riduzione della proteinuria nei pazienti trattati con IFN α , mentre in 5 pazienti del gruppo trattato con steroidi, si otteneva una remissione completa o parziale della proteinuria, senza alcun peggioramento del danno epatico, né alcun effetto sulla viremia.

Analogamente, D'Amico et al. (5) non ha riporta-

to alcuna evidenza di danno epatico acuto (aumento degli enzimi epatici) a seguito della terapia immunosoppressiva nella sua casistica di pazienti con GN crioglobulinemica HCV-correlata, con buoni risultati sull'*outcome* renale.

Campise et al. (29) suggeriscono di trattare aggressivamente le *flares* acute della GN crioglobulinemica con boli endovenosi di Metilprednisolone (MP) (0.5-1 g/die per 3 giorni consecutivi), seguiti da prednisone (Pr) alla dose di 0.5 mg/kg/die per os, con lenta riduzione fino alla dose di mantenimento di 0.1-0.2 mg/kg/die per 3-6 mesi, da associare, nei casi più gravi, a ciclofosfamide per os (1-2 mg/kg/die) per 2 mesi (Tab. III). In 27 casi di esacerbazione renale, la *pulse therapy* con MP era seguita, già entro la prima settimana, da una riduzione della creatinemia osservabile nell'85% dei pazienti, con un effetto più tardivo sulla proteinuria e sul criocrito.

Garini et al. (30) propongono, invece, per il trattamento delle *flares* acute della GN crioglobulinemica, la somministrazione sequenziale di immunosoppressori e terapia antivirale. Un iniziale breve ciclo (2-3 mesi) di steroidi (0.5-1 g di MP e.v. per tre giorni consecutivi seguito da Pr orale 1 mg/kg/die per un mese con graduale riduzione dopo 3-4 settimane) e ciclofosfamide per os (2 mg/kg/die) viene somministrato per controllare la fase acuta della malattia. Una volta raggiunta la remissione clinica (riduzione o stabilizzazione della creatinemia, riduzione della proteinuria, assenza di *casts* eritrocitari) la terapia immunosoppressiva viene interrotta e sostituita dalla terapia antivirale volta ad eradicare il virus C.

Nei pazienti con malattia renale lieve o moderata gli Autori suggeriscono in prima linea una terapia combinata Peg-IFN α + RIBA, della durata di 6-12 mesi (secondo il genotipo virale). A tale proposito la biopsia renale può essere utile nell'identificare i pazienti candidabili alla sola terapia antivirale o a quella combinata sulla base del grado di attività istologica

TABELLA III - SCHEMA DI TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA

Schema terapeutico:

Metilprednisone 0.5-1 g/die per 3 giorni consecutivi seguito da

Pr 0.5-1 mg pro kg di p.c./die con graduale riduzione dopo 3-4 settimane fino alla sospensione in 3-6 mesi

Nei casi più gravi associare:

Ciclofosfamide 2 mg pro kg di p.c./die per 2-3 mesi e/o

Plasmaferesi 3 sedute a settimana per 2-3 settimane (1-1.5 volumi di plasma per seduta)

della malattia. In un ampio studio multicentrico Italiano (1) la distinzione tra specifiche lesioni istologiche attive (proliferazione endocapillare e mesangiale, semilune cellulari, infiltrati interstiziali, aspetto a doppio contorno della parete capillare glomerulare, pseudotrombi endoluminali, arterite, microangiopatia) e croniche (sclerosi glomerulare globale e/o segmentale, sclerosi mesangiale, semilune fibrotiche, fibrosi interstiziale ed atrofia tubulare, aterosclerosi) è stata impiegata come sistema di score del grado di attività e cronicità di malattia.

Oltre al rischio di incremento della replicazione virale, la terapia immunosoppressiva è però gravata da altri effetti collaterali: aumentato rischio di infezioni, ipertensione arteriosa, malattie cardiovascolari e neoplasie. Inoltre essa non agisce sul fattore eziologico della malattia (infezione da HCV). Pertanto andrebbe limitata ai pazienti con malattia renale severa o intolleranza alla terapia antivirale.

Inoltre, l'approccio terapeutico sequenziale, seppure fondato su presupposti patogenetici, rimane comunque supportato solo dall'esperienza clinica degli Autori e da alcuni casi aneddotici.

3) Rituximab

Il Rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico diretto contro il recettore di superficie CD20, espresso stabilmente sulle cellule B mature ed immature, ma non sulle plasmacellule. Tramite i meccanismi di apoptosi, citotossicità cellulare anticorpo-mediata e complemento-dipendente, esso è in grado di causare una profonda deplezione delle cellule B circolanti, che non sono più ritrovabili nel sangue periferico. Tale deplezione persiste fino a 6 mesi dopo la somministrazione del farmaco.

Il Rituximab è stato approvato nel 1997 per la terapia dei linfomi non Hodgkin e nel 2007 per la terapia dell'artrite reumatoide refrattaria agli anti TNF α (32). Il suo impiego è stato però esteso a diverse malattie autoimmuni, quali il LES (33-37) e le vasculiti ANCA associate (37-40) e alla glomerulonefrite membranosa idiopatica (41, 42).

La deplezione selettiva delle cellule B mediata dal Rituximab spiega il suo possibile utilizzo nella vasculite crioglobulinemica, in quanto, bloccando la ricostituzione delle plasmacellule, interferirebbe sulla produzione di IgM monoclonali, la sintesi delle crioglobuline e la deposizione di IC a livello renale.

I dati disponibili in letteratura sull'uso del Rituximab nella GNMP crioglobulinemica HCV-correlata sono limitati ad alcuni *case reports* (43, 44) e 4 *trials* clinici non controllati (45-48).

I primi 2 studi includevano il più ampio numero di pazienti con vasculite crioglobulinemica, rispettivamente 20 e 15, ma solo 2 pazienti nello studio di Zaya et al. (45), e 1 in quello di Sansonno et al. (46), presentavano un coinvolgimento renale. Essi, pertanto, mostravano l'efficacia del Rituximab sulle manifestazioni cutanee della vasculite crioglobulinemica (ulcere, porpora, orticaria), la neuropatia periferica e i sintomi costituzionali, ma non consentivano di trarre conclusioni sull'efficacia del Rituximab nella nefropatia.

Nello studio di Zaya (45), solo 1 dei 2 pazienti affetti da GNMP crioglobulinemica presentava una rapida risposta alla terapia con Rituximab, con scomparsa della proteinuria e inattivazione del sedimento urinario. Nel secondo paziente, in cui la malattia renale era di lunga durata, non si otteneva alcuna riduzione della proteinuria e della creatinemia, e il trattamento veniva interrotto alla seconda infusione per l'insorgenza di trombosi dell'arteria retinica. Nello studio di Sansonno (46), l'unico paziente con coinvolgimento renale (GNMP) non presentava un significativo miglioramento dei parametri funzionali renali.

Successivamente, Roccatello et al. (47) riportava i risultati di uno studio condotto su 6 pazienti HCV positivi affetti da crioglobulinemia mista di tipo II in fase di attività, di cui 5 con interessamento renale (n=2 sindrome nefrosica; n=3 anomalie urinarie; n=2 insufficienza renale), trattati con Rituximab per intolleranza o resistenza alla terapia immunosoppressiva standard o per infiltrazione linfocitaria del midollo. Il Rituximab veniva somministrato per via endovenosa al dosaggio di 375 mg/m² a settimana per 4 settimane (dose "lin-

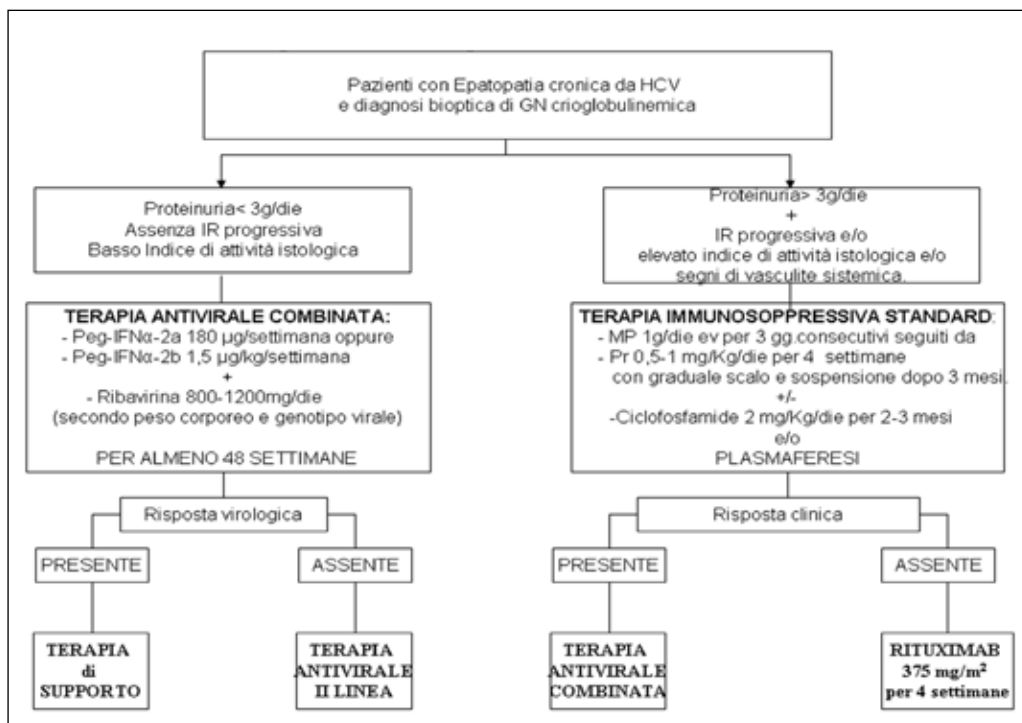


Fig. 1 - Proposta di algoritmo terapeutico per la glomerulonefrite crioglobulinemica HCV-correlata.

foma”). Due dosi aggiuntive venivano somministrate a distanza di 1 e 2 mesi. I livelli di proteinuria e criocrito si riducevano significativamente rispetto ai valori basali al 2°, 6° e 12° mese dopo la prima infusione, con una scomparsa o un miglioramento dei sintomi costituzionali (porpora, stanchezza, artralgie, febbre), senza sostanziali variazioni degli indici di citolisi epatica. Gli Autori concludevano che il Rituximab potrebbe rappresentare una opzione terapeutica efficace e sicura nei pazienti con glomerulonefrite crioglobulinemica HCV-associata e segni di vasculite sistemica.

Uno studio più recente di Quartuccio et al. (48) riportava i risultati della terapia con Rituximab in 5 pazienti con GN crioglobulinemica HCV-correlata in fase attiva ma non acuta. Il Rituximab veniva somministrato alla “dose linfoma” e utilizzato in 3 pazienti come terapia di prima linea. Al termine del ciclo terapeutico si osservava una rapida riduzione della proteinuria in tutti i casi, e un miglioramento della funzione renale in 3 casi su 3 con ridotto filtrato glomerulare in basale. Solo 1 paziente presentava una remissione sostenuta (fino al 21° mese di follow-up) senza necessità di ritrattamento, mentre 3 pazienti erano relapsers; 2 di loro, sottoposti ad un nuovo ciclo di Rituximab, presentavano una nuova risposta renale. Il Rituximab veniva somministrato in monoterapia e tutti i pazienti, tranne uno, rimanevano liberi da steroidi nel corso del follow-up successivo.

Sulla base dei dati disponibili, il Rituximab può rappresentare una valida alternativa alle terapia conven-

zionale, nei pazienti refrattari o intolleranti alla stessa, consentendo un significativo risparmio in termini di dose di farmaci immunosoppressori.

Gli effetti collaterali della terapia con Rituximab descritti in questo sottogruppo di pazienti sono relativamente pochi e facilmente gestibili. Un problema correlato all’uso del Rituximab potrebbe essere rappresentato dal suo potenziale impatto sulla viremia, come descritto già nello studio di Sansonno (46), in cui la carica virale media del virus C aumentava significativamente al 6° e 12° mese di follow-up. Tuttavia Zaya (45) e Roccatello (47) non osservavano un significativo incremento della viremia successivo a terapia con Rituximab nella loro serie di pazienti. Un’ulteriore conferma dell’efficacia e sicurezza del farmaco viene da uno studio pilota (49) sull’uso di basse dosi di Rituximab (250 mg/m² x 2 anziché 375 mg/m² x 4) in 6 pazienti con crioglobulinemia severa. Quattro (80%) dei 5 pazienti valutabili ottenevano una completa risposta clinica (risoluzione dei segni e sintomi di vasculite) e sierologica (riduzione significativa del criocrito accompagnata da deplezione dei linfociti B). Un paziente con coinvolgimento renale severo (insufficienza renale acuta e sindrome nefrosica) presentava, al termine del follow-up, normalizzazione della creatinemia e remissione parziale della proteinuria (da un basale di 4.7 g/die a 0.4 g/die). Infine, la carica virale valutata dopo 20 e 40 settimane di follow-up, non mostrava variazioni significative. Sebbene l’uso del Rituximab nei pazienti con vasculite crioglobulinemica

HCV-correlata si associò nei 2/3 dei casi riportati in letteratura con una significativa risposta clinica (50), la persistenza dello stimolo antigenico della vasculite, costituito dal virus C, rimane un problema significativo in quanto espone al rischio di recidiva alla sospensione del trattamento. Pertanto è da valutare l'utilità di una strategia terapeutica sequenziale, costituita dal Rituximab per il trattamento del processo infiammatorio sottostante la vasculite, seguito da Peg-IFN α + ribavirina. I risultati di un recente studio pilota (51) sull'uso di tale terapia di combinazione in 16 pazienti con vasculite crioglobulinemica HCV-associata, resistente (n=11) o recidivante (n=5) al trattamento antivirale con interferone standard o peghilato e ribavirina, sembrano incoraggianti. Dopo terapia con Rituximab alla "dose linfoma", seguita da terapia antivirale con Peg IFN α e ribavirina per una durata di 12 mesi, una risposta clinica completa veniva osservata nel 62.5% dei pazienti, in associazione con un azzeramento della viremia e dei livelli di crioglobuline. Per quanto concerne l'*outcome* renale, una completa remissione della nefropatia era raggiunta nel 57.2% dei casi, con una scomparsa della proteinuria e dell'ematuria in 5/7 pazienti e 7/7 pazienti, rispettivamente, ed un miglioramento significativo del GFR (p=0.007).

È da sottolineare, inoltre, che tale trattamento sequenziale era ben tollerato e si associava solo ad un leggero incremento, non significativo, della viremia, dopo l'ultima infusione di Rituximab.

Tuttavia, in assenza di dati che supportino un effetto promuovente del Rituximab sulla replicazione del virus C dell'epatite (anche nello studio sopra riportato il trattamento con anti CD-20 non si associava ad un incremento significativo della viremia), rimane ancora dibattuta la necessità di far seguire al Rituximab una terapia protratta con antivirali.

TEST DI VERIFICA

7) In quale gruppo di pazienti affetti da glomerulonefrite crioglobulinemica da HCV è indicata in prima linea la terapia immunosoppressiva?

- Sindrome nefrosica ingravescente
- Insufficienza renale a rapida progressione
- Elevato score istologico di attività della glomerulonefrite
- Vasculite sistemica
- Tutte le precedenti.

8) Qual è lo schema di terapia immunosoppressiva più indicato nella glomerulonefrite crioglobulinemica HCV-correlata?

- Breve ciclo (2-3 mesi) di pr per os al dosaggio di 0.5 mg/kg/die

- Breve ciclo (2-3 mesi) di pr per os al dosaggio di 0.5 mg/kg/die, preceduto da 3 boli e.v. di metilprednisolone da 1 g ciascuno, in associazione o meno a ciclofosfamide al dosaggio di 1-2 mg/kg/die per os
- Ciclofosfamide da sola al dosaggio di 2-3 mg/kg/die per os
- Pr per os al dosaggio di 1 mg/kg/die per 6-9 mesi
- Nessuna delle precedenti.

9) Cos'è il Rituximab?

- Anticorpo monoclonale anti CD-20
- Inibitore della calcineurina
- Anticorpo monoclonale anti CD-4
- Anticorpo monoclonale anti TNF α
- Farmaco antivirale di nuova generazione.

CONCLUSIONI

La terapia della GNMP crioglobulinemica HCV correlata si basa su molteplici opzioni: 1) i farmaci antivirali, e precisamente la terapia di associazione Peg-IFN α e ribavirina, la cui efficacia sembra essere correlata all'eliminazione dell'agente eziologico della glomerulopatia, cioè il virus dell'epatite C; 2) la terapia immunosoppressiva standard (corticosteroidi, ciclofosfamide, plasmaferesi) volta a ridurre i livelli di crioglobuline circolanti e la deposizione degli immunocomplessi a livello glomerulare; 3) il trattamento sequenziale, costituito dall'utilizzo in successione della terapia immunosoppressiva e di quella antivirale; 4) il Rituximab, anticorpo monoclonale anti CD-20, il cui meccanismo d'azione consiste nella deplezione selettiva dei linfociti B.

La terapia antivirale, pur in mancanza di dati definitivi, rimane quella raccomandata per il trattamento della vasculite crioglobulinemica HCV-correlata, con o senza coinvolgimento renale (52).

In assenza, nei prossimi anni, di *trials* clinici randomizzati (53) che possano chiarire il ruolo della terapia immunosoppressiva standard in termini di *outcome* renale nei pazienti affetti da GN crioglobulinemica HCV-correlata, possiamo limitarci a suggerire un approccio terapeutico basato sulla severità del quadro clinico e istopatologico (Fig. 1). La terapia immunosoppressiva, nonostante il rischio di incremento della replicazione virale, è indicata in caso di severo coinvolgimento renale e/o sistemico, ma deve essere seguita da una terapia antivirale per l'eradicazione del virus C e la riduzione del rischio di recidiva della glomerulonefrite. Al contrario, la terapia antivirale è consigliata come trattamento di prima linea nella malattia renale lieve-moderata e in fase stazionaria.

Infine, il Rituximab costituisce una promettente opzione terapeutica alternativa alla terapia immunosoppressiva classica, nei pazienti con vasculite crioglobulinemica severa e/o refrattaria.

RIASSUNTO

La glomerulonefrite membranoproliferativa HCV-correlata è la causa più frequente di danno renale associato ad epatite C. Il suo trattamento rimane ad oggi ancora controverso e si basa su poche evidenze sperimentali. L'approccio terapeutico consigliato varia in base alla severità della malattia renale. Nei pazienti con danno renale clinico ed istologico lieve-moderato la terapia di prima linea è quella antivirale basata sull'associazione di interferone α peghilato (Peg-IFN α) e ribavirina per almeno 48 settimane insieme ad una terapia conservativa (diuretici, ACE-inibitori e/o antagonisti recettoriali

dell'angiotensina II). Nei casi di coinvolgimento renale più severo (sindrome nefrosica franca, sindrome nefritica acuta e/o insufficienza renale rapidamente progressiva, elevato score istologico di attività della glomerulonefrite) la strategia sequenziale con immunosoppressori (plasmaferesi, steroidi e ciclofosfamide) seguiti da antivirali, seppure non supportata in letteratura da dati definitivi, può essere proposta quale modalità iniziale di trattamento. L'uso di farmaci biologici, quali il Rituximab, può rappresentare una sicura ed efficace alternativa alla terapia convenzionale nei pazienti refrattari o intolleranti alla stessa. Trials clinici randomizzati e controllati sono necessari per poter meglio definire Linee Guida per il trattamento della glomerulonefrite HCV-correlata.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Roccatello D, Fornasieri A, Giachino O, et al. Multicenter study on hepatitis C virus-related cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 2007; 49: 69-82.
2. Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. The GERMIVIC. Groupe d'Etude et de Recherche en Médecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hépatite C. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79: 47-56.
3. Ferri C, Zignego AL, Pileri SA. Cryoglobulins. *J Clin Pathol* 2002; 55: 4-13.
4. Gorevic PD, Kassab HJ, Levo Y, et al. Mixed cryoglobulinemia: clinical aspects and long-term follow-up of 40 patients. *Am J Med* 1980; 69: 287-308.
5. D'Amico G. Renal involvement in hepatitis C infection: cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998; 54: 650-71.
6. Morales J, Morales E, Andrés A, Praga M. Glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8: 205-11.
7. Stehman-Breen C, Alpers CE, Fleet WP, Johnson RJ. Focal segmental glomerular sclerosis among patients infected with hepatitis C virus. *Nephron* 1999; 81: 37-40.
8. Johnson RJ, Gretch DR, Couser WG, et al. Hepatitis C virus-associated glomerulonephritis. Effect of alpha-interferon therapy. *Kidney Int* 1994; 46: 1700-4.
9. Monti G, Galli M, Invernizzi F, et al. Cryoglobulinemias: a multi-centre study of the early clinical and laboratory manifestations of primary and secondary disease. GISC. Italian Group for the Study of Cryoglobulinaemias. *QJM* 1995; 88: 115-26.
10. Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993; 328: 465-70.
11. Sansonno D, Gesualdo L, Manno C, Schena FP, Dammacco F. Hepatitis C virus-related proteins in kidney tissue from hepatitis C virus-infected patients with cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis. *Hepatology* 1997; 25: 1237-44.
12. Tarantino A, Campise M, Banfi G, et al. Long-term predictors of survival in essential mixed cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1995; 47: 618-23.
13. Misiani R, Bellavita P, Fenili D, et al. Interferon alfa-2a therapy in cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus. *N Engl J Med* 1994; 330: 751-6.
14. Myers RP, Regimbeau C, Thevenot T, et al. Interferon for interferon naive patients with chronic hepatitis C. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; (2): CD000370.
15. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485-92.
16. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 1998; 352: 1426-32.
17. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958-65.
18. Cacoub P, Saadoun D, Limal N, Sene D, Lidove O, Piette JC. PEGylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment in patients with hepatitis C virus-related systemic vasculitis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 911-5.
19. Bruchfeld A, Lindahl K, Ståhle L, Söderberg M, Schvarcz R. Interferon and ribavirin treatment in patients with hepatitis C-associated renal disease and renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1573-80.
20. Alric L, Plaisier E, Thébaud S, et al. Influence of antiviral therapy in hepatitis C virus-associated cryoglobulinemic MPGN. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 617-23.
21. Sabry AA, Sobh MA, Sheaashaa HA, et al. Effect of combina-

- tion therapy (ribavirin and interferon) in HCV-related glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1924-30.
22. Ponticelli C, Montagnino G, Campise R, Baldassarri A, Tarantino A. Treatment of renal disease in essential mixed cryoglobulinemia. In: Ponticelli C, Minetti L, D'Amico G, ed. *Antiglobulins cryoglobulins and glomerulonephritis*. New York: Martinus Nijhoff, 1986; 265-72.
 23. Boonyapisit K, Katirji B. Severe exacerbation of hepatitis C-associated vasculitic neuropathy following treatment with interferon alpha: a case report and literature review. *Muscle Nerve* 2002; 25: 909-13.
 24. Gordon AC, Edgar JD, Finch RG. Acute exacerbation of vasculitis during interferon-alpha therapy for hepatitis C-associated cryoglobulinaemia. *J Infect* 1998; 36: 229-30.
 25. Otha S, Yokoyama H, Wada T, et al. Exacerbation of glomerulonephritis in subjects with chronic hepatitis C virus infection after interferon therapy. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 1040-8.
 26. Quigg RJ, Bathwaite M, Gardner DF, Gretch DR, Ruddy S. Successful cyclophosphamide treatment of cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *Am J Kidney Dis* 1995; 25: 798-800.
 27. Nishi S, Ueno M, Shimada H, et al. Treatment of membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C Virus infection. Niigata Research Group of Glomerulonephritis and Nephrotic Syndrome. *Intern Med* 2000; 39: 788-93.
 28. Komatsuda A, Imai H, Wakui H, et al. Clinicopathological analysis and therapy in hepatitis C virus-associated nephropathy. *Intern Med* 1996; 35: 529-33.
 29. Campise M, Tarantino A. Glomerulonephritis in mixed cryoglobulinaemia: what treatment? *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 281-3.
 30. Garini G, Allegri L, Lannuzzella F, Vaglio A, Buzio C. HCV-related cryoglobulinemic glomerulonephritis: implications of antiviral and immunosuppressive therapies. *Acta Biomed* 2007; 78: 51-9.
 31. Prasad M, Buller GK, Mena CI, Sofair AN. Clinical problem-solving. Sum of the parts. *N Engl J Med* 2006; 355: 2468-73.
 32. McGonagle D, Tan AL, Madden J, Taylor L, Emery P. Rituximab use in everyday clinical practice as a first-line biologic therapy for the treatment of DMARD-resistant rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47 (6): 865-7. Epub 2008 Apr 4.
 33. Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, et al. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2580-9.
 34. Vigna-Perez M, Hernández-Castro B, Paredes-Saharopulos O, et al. Clinical and immunological effects of Rituximab in patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy: a pilot study. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R83. Epub 2006 May 5.
 35. Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC, Ehrenstein MR, Isenberg DA. B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 1542-5. Epub 2005 Sep 27.
 36. Smith KG, Jones RB, Burns SM, Jayne DR. Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis: Remission, relapse, and re-treatment. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2970-82.
 37. Walsh M, Jayne D. Rituximab in the treatment of anti-neutrophil cytoplasm antibody associated vasculitis and systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Kidney Int* 2007; 72: 676-82. Epub 2007 Jul 4.
 38. Eriksson P. Nine patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis successfully treated with rituximab. *J Intern Med* 2005; 257: 540-8.
 39. Keogh KA, Ytterberg SR, Fervenza FC, Carlson KA, Schroeder DR, Specks U. Rituximab for refractory Wegener's granulomatosis: report of a prospective, open-label pilot trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 180-7. Epub 2005 Oct 13.
 40. Stasi R, Ripa E, Del Poeta G, Amadori S, Newland AC, Provan D. Long-term observation of patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis treated with rituximab. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 1432-6. Epub 2006 Apr 21.
 41. Ruggenenti P, Chiurciu C, Brusegan V, et al. Rituximab in Idiopathic membranous nephropathy: a one-year prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1851-7.
 42. Ruggenenti P, Chiurciu C, Abbate M, et al. Rituximab for idiopathic membranous nephropathy: who can benefit? *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1 (4): 738-48. Epub 2006 Jun 14.
 43. Lamprecht P, Lerin-Lozano C, Merz H, et al. Rituximab induces remission in refractory HCV associated cryoglobulinaemic vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1230-3.
 44. Bestard O, Cruzado JM, Ercilla G, et al. Rituximab induces regression in of hepatitis C virus-related membranoproliferative glomerulonephritis in a renal allograft. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2320-4. Epub 2006 Jun 4.
 45. Zaja F, De Vita S, Mazzaro C, et al. Efficacy and safety of rituximab in type II mixed cryoglobulinemia. *Blood* 2003; 101: 3827-34. Epub 2003 Jan 30.
 46. Sansonno D, De Re V, Lauletta G, Tucci FA, Boiocchi M, Dammacco F. Monoclonal antibody treatment of mixed cryoglobulinemia resistant to interferon alpha with an anti-CD20. *Blood* 2003; 101: 3818-26. Epub 2002 Dec 27.
 47. Roccatello D, Baldovino S, Rossi D, et al. Long-term effects of anti-CD20 monoclonal antibody treatment of cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 3054-61. Epub 2004 Oct 19.
 48. Quartuccio L, Soardo G, Romano G, et al. Rituximab treatment for glomerulonephritis in HCV-associated mixed cryoglobulinemia: efficacy and safety in the absence of steroids. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 842-6. Epub 2006 Jan 17.
 49. Visentini M, Granata M, Veneziano ML, et al. Efficacy of low-dose rituximab for mixed cryoglobulinemia. *Clin Immunol* 2007; 125: 30-3. Epub 2007 Aug 9.
 50. Cacoub P, Delluc A, Saadoun D, Landau DA, Sene D. Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) treatment for cryoglobulinemic vasculitis: where do we stand? *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 283-7. Epub 2007 Jul 20.
 51. Saadoun D, Resche-Rigon M, Sene D, et al. Rituximab combined with Peg-interferon-ribavirin in refractory hepatitis C virus-associated cryoglobulinaemia vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1431-6. Epub 2008 Jan 4.
 52. Mukhtyar C, Guillevin L, Cid CM, et al. EULAR recommendation for the management of primary small and medium vessel vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 310-7. Epub 2008 Apr 15.
 53. [http:// www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)