



LEIDS UNIVERSITAIR MEDISCH CENTRUM

# Evaluatie van complementdiagnostiek

*Nabespreking SKML rondzending*

*Utrecht, 19 januari 2010*

*Anja Roos (A.Roos@LUMC.NL)*

*Medisch Immunoloog*

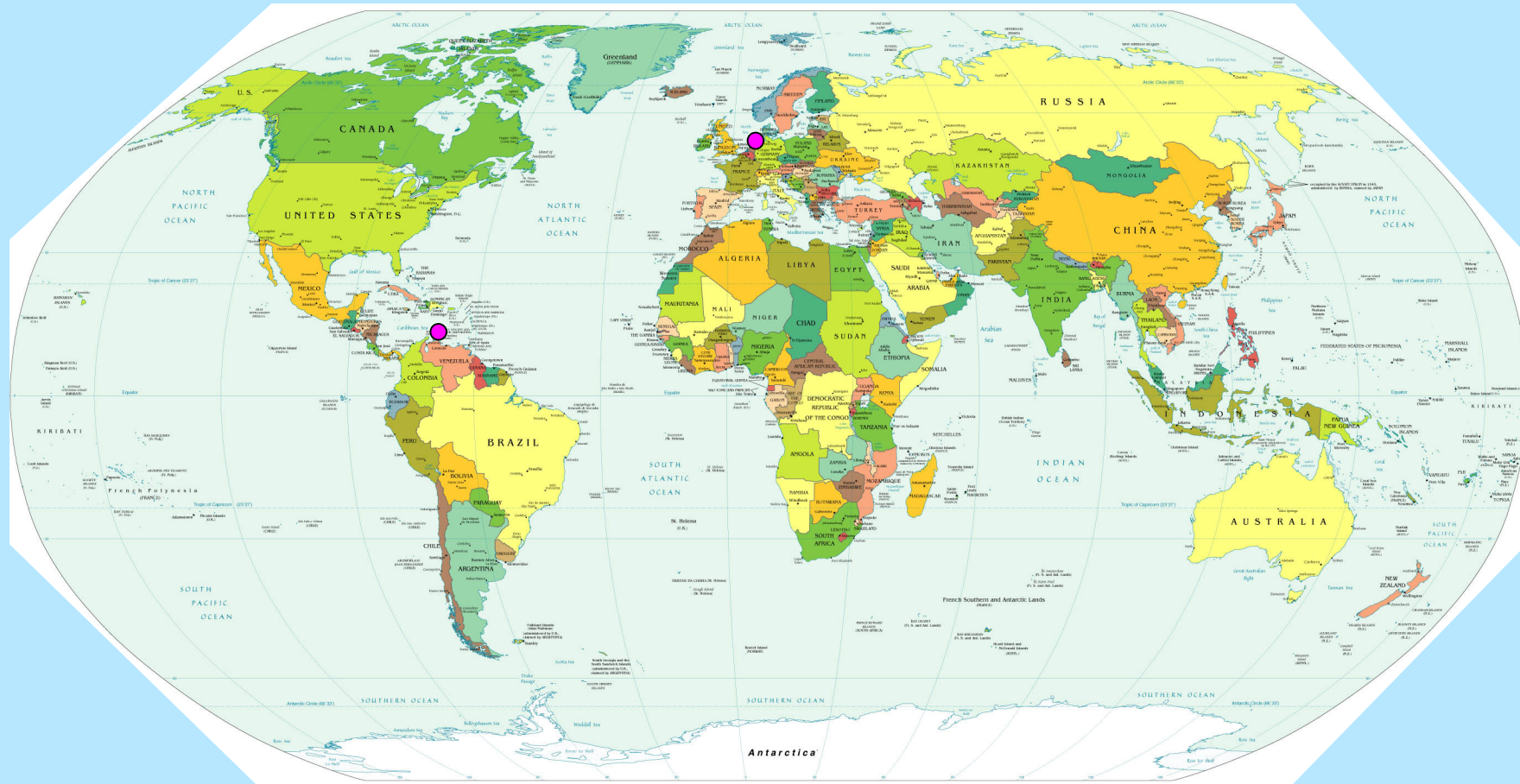
*Leids Universitair Medisch Centrum*



# Rondzending complement: deelnemende laboratoria (2008)



# Rondzending complement: deelnemende laboratoria (2009)



# Opzet van de rondzending

- Eén maal per jaar, 16 deelnemers
- Vijf of zes serummonsters
- Standaardmonster
- Verzending in bevroren toestand op droogijs
- Meten: CP, AP, MBL-P, C1q, C4 en C3
- Resultaten in eigen eenheden EN gerelateerd aan de meegestuurde standaard
- Rapportage nog niet in Qbase

# Het nut van complementdiagnostiek

- Diagnostiek van genetische deficiënties van complementfactoren
  - Primaire immuundeficiënties, autoimmuunziekten
- Diagnostiek van genetische deficiënties van complementregulators
  - Immuundeficiënties, atypische HUS, membranoproliferatieve glomerulonefritis, angiooedeem
- Aantonen van complementconsumptie bij diagnostiek en follow-up van autoimmuun- en inflammatoire ziektebeelden
  - SLE, cryoglobulinemie, post-streptococcenglomerulonefritis
- *Monitoring van therapie (bv. eculizumab (anti-C5))*
- *Risicofraterificatie (bv. op MBL bij transplantatie)*

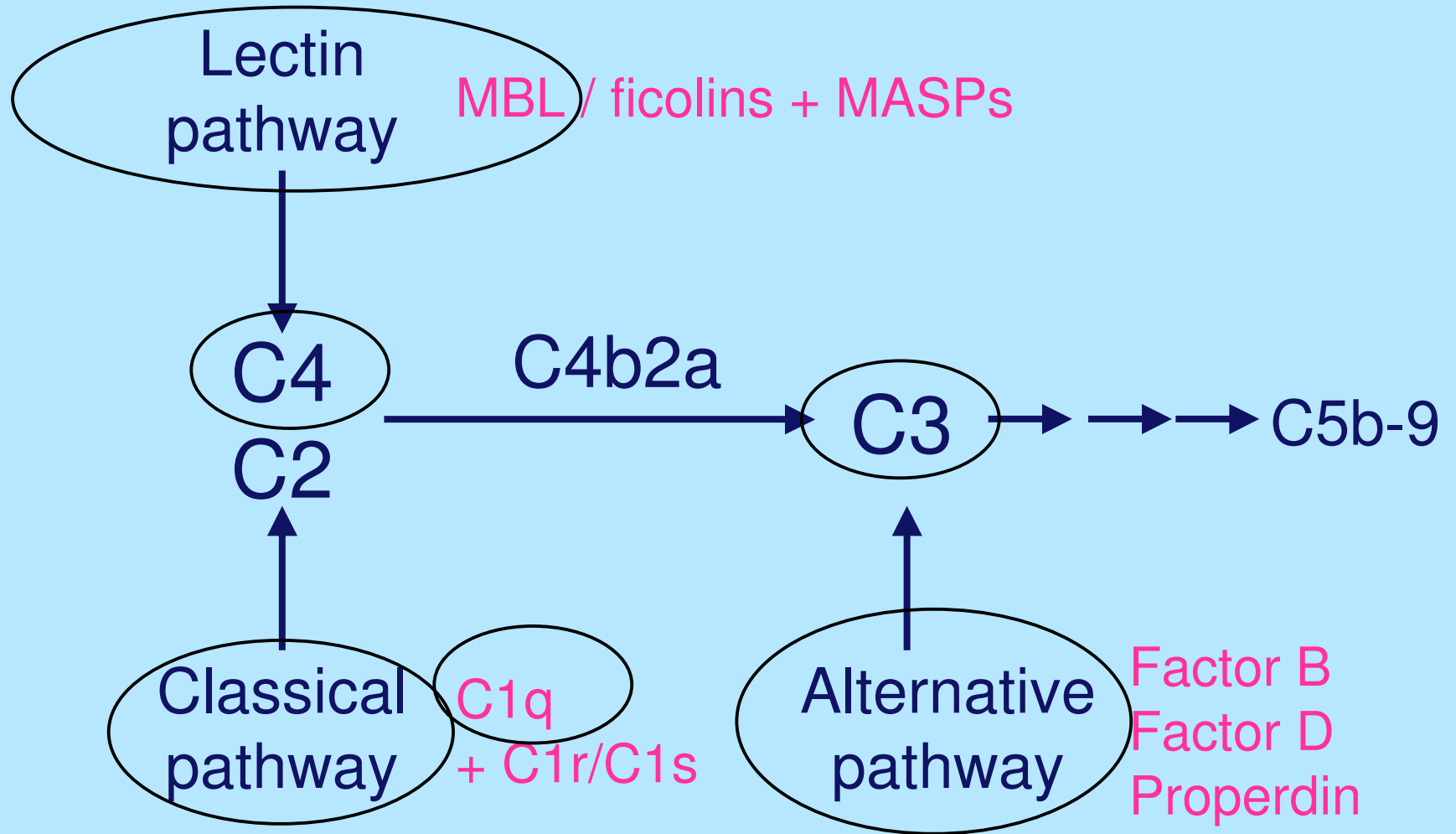
## Complement diagnostiek: verschillende benaderingen

- Functionele analyse van de drie routes
- Meting van concentratie van individuele componenten
- Functionele analyse van individuele componenten
- Meting van complementactivatieproducten
- Detectie van complementregulators op het celoppervlak
- Meting van autoantistoffen tegen complementfactoren
- Genetische analyse

## Complement diagnostiek: verschillende benaderingen

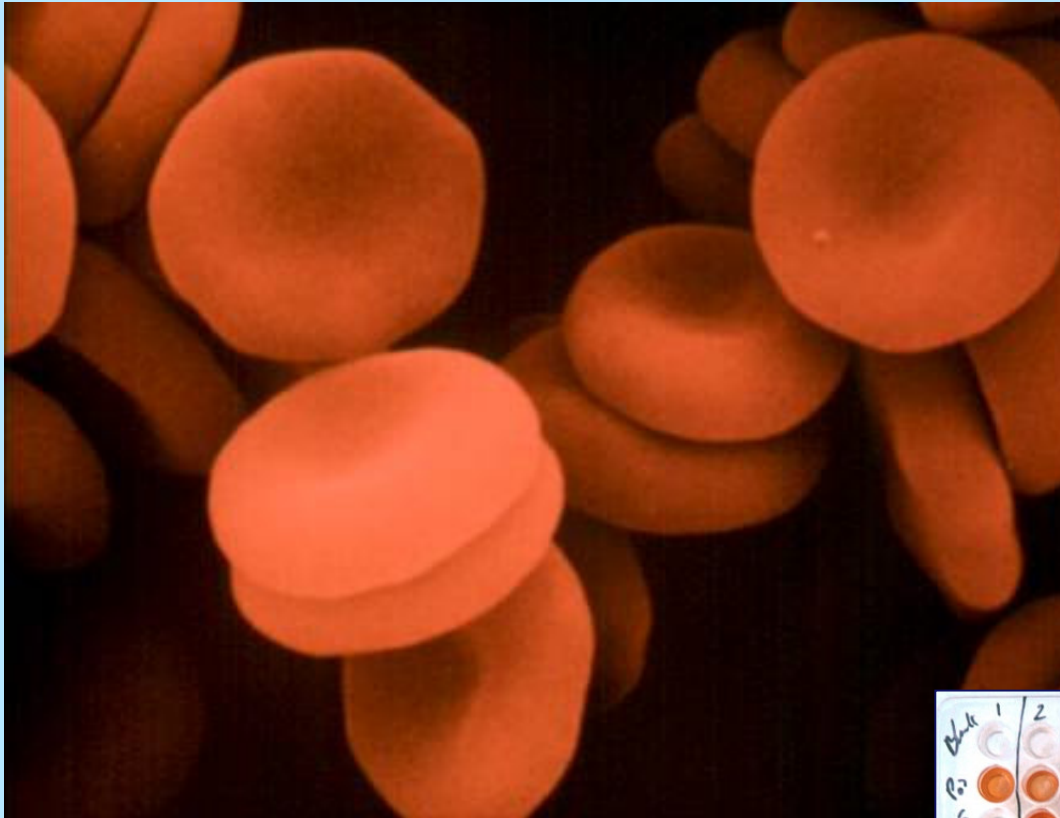
- Functionele analyse van de drie routes
- Meting van concentratie van individuele componenten
- Functionele analyse van individuele componenten
- Meting van complementactivatieproducten
- Detectie van complementregulators op het celoppervlak
- Meting van autoantistoffen tegen complementfactoren
- Genetische analyse

# Activatie van het complement systeem

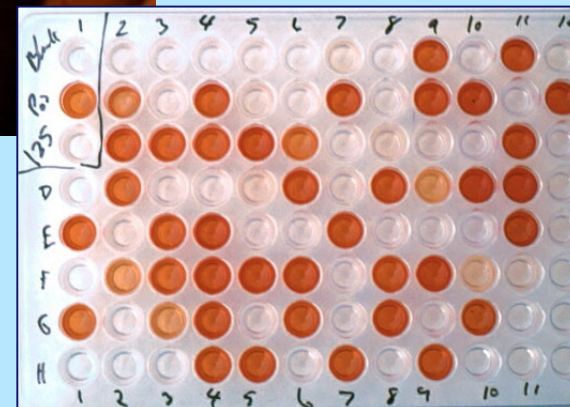




# Functionele analyse van de drie routes

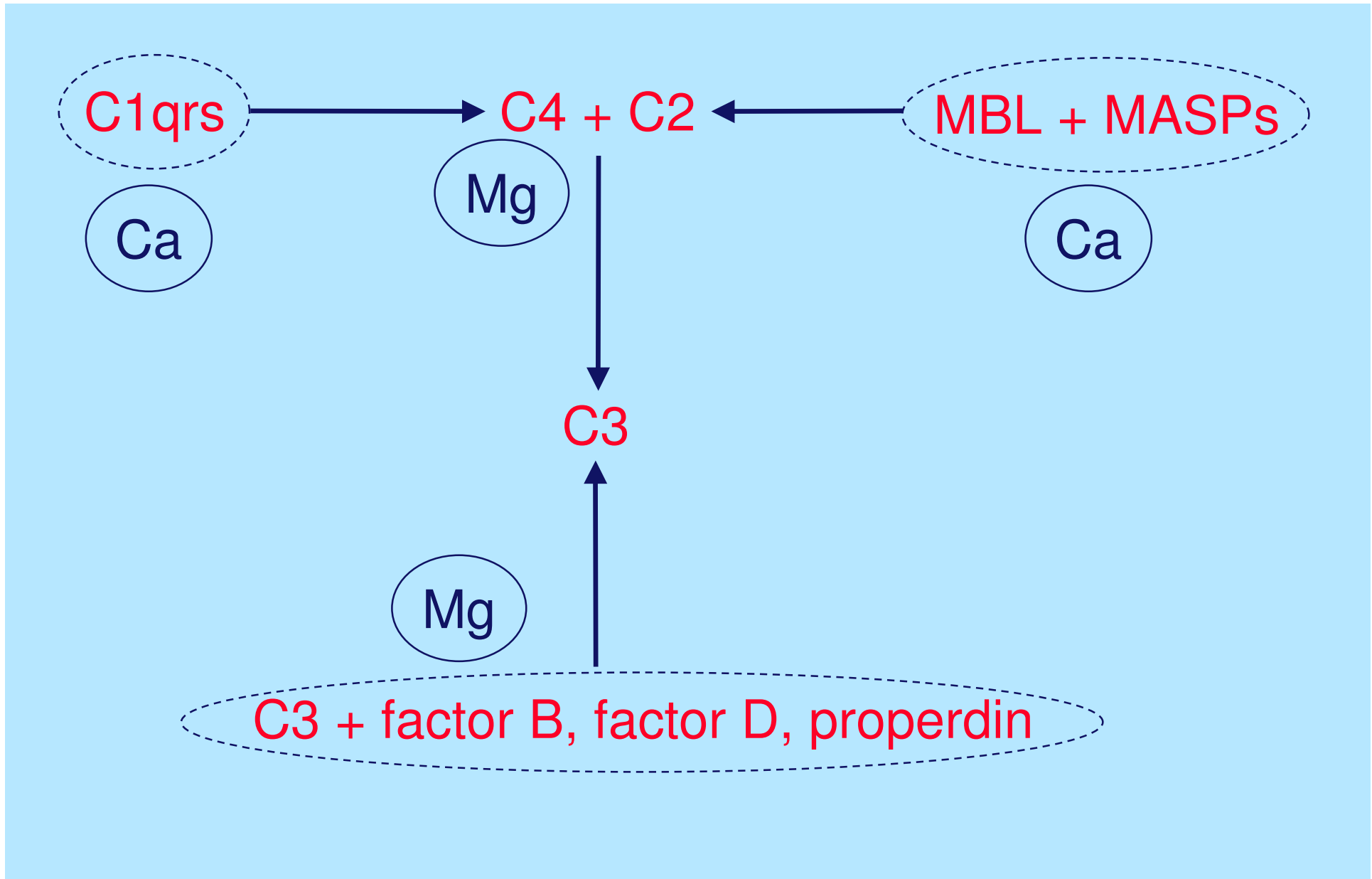


Hemolytische assays



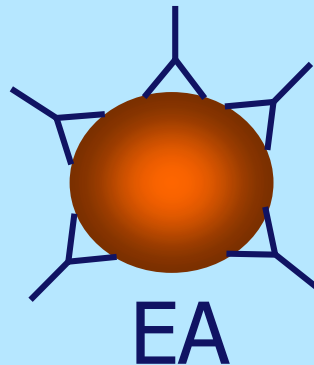
ELISA

# Activation of C3: metal ion dependence



# Hemolytic assay for quantification of classical pathway complement activity: CH50

Sheep erythrocytes  
+  
Rabbit antibodies



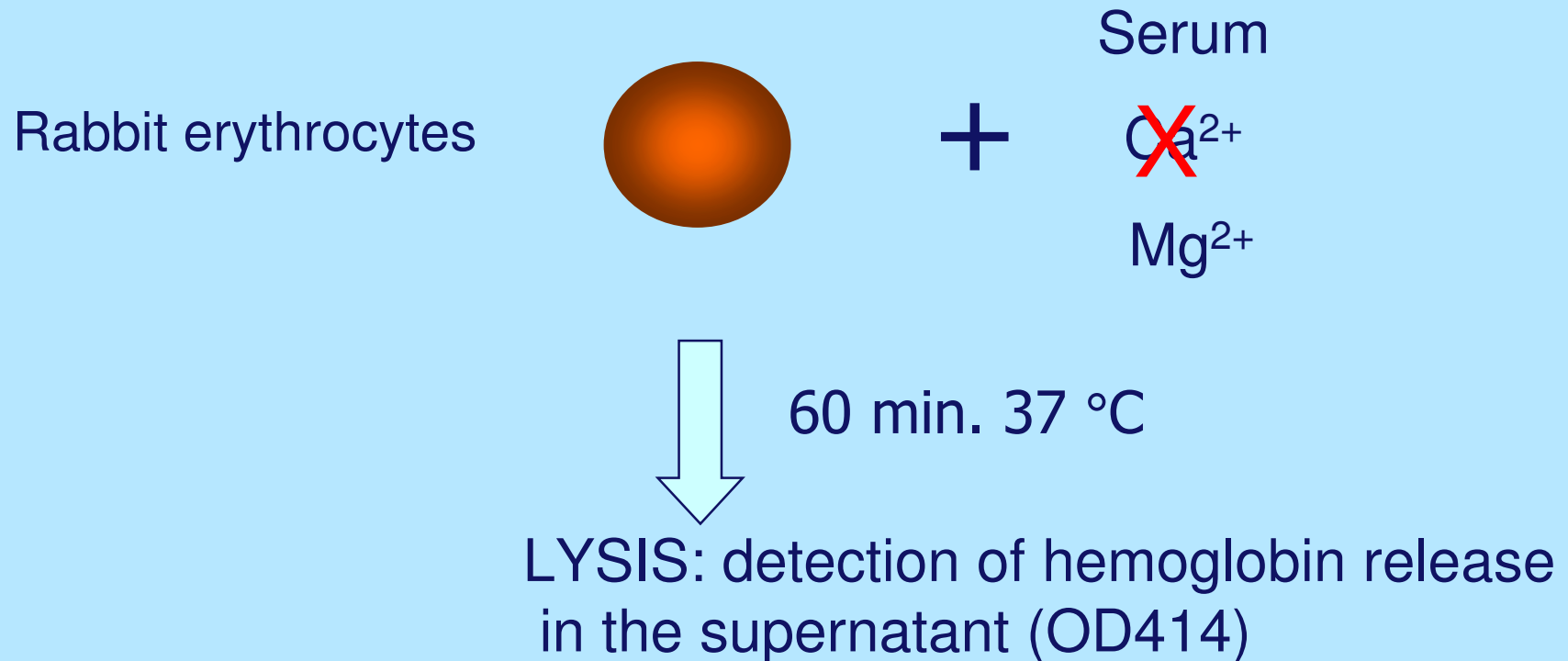
+

Serum  
Ca<sup>2+</sup>  
Mg<sup>2+</sup>

60 min. 37 °C

LYSIS: detection of hemoglobin release  
in the supernatant (OD414)

# Hemolytic assay for quantification of alternative pathway complement activity: **AP50**





# ELISA assays for quantification of the functional activity of three complement activation pathways

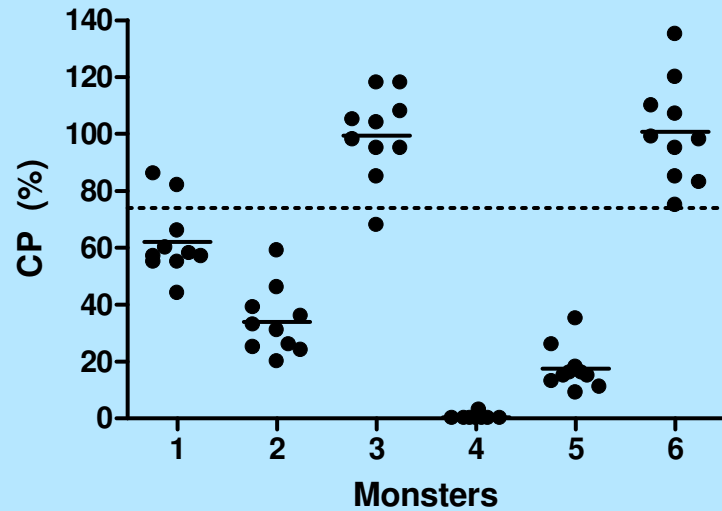
	Coating	Buffer	Detection		
			C4	C3	C5b-9
Classical pathway	hu IgM	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	+	+	+
Lectin pathway	mannan	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> anti-C1q mAb	+	+	+
Alternative pathway	LPS	MgEGTA	-	+	+

## Functionele assays voor drie complementroutes

	CP	AP	MBL
• Aantal deelnemers:	16	15	9
• Methoden:			
• Wieslab ELISA	10	11	7
• In house ELISA	1	1	2
• Hemolytisch	5	3	
• Refwaarden Wieslab	> 68 – 80	> 30 – 67	>10
	> 10	> 10	> 0.1

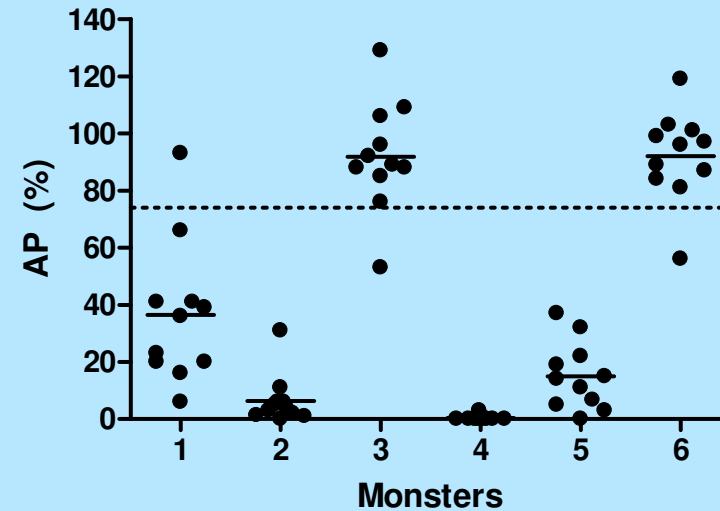
# Klassieke en alternatieve route: Resultaten rondzending 2008

CP



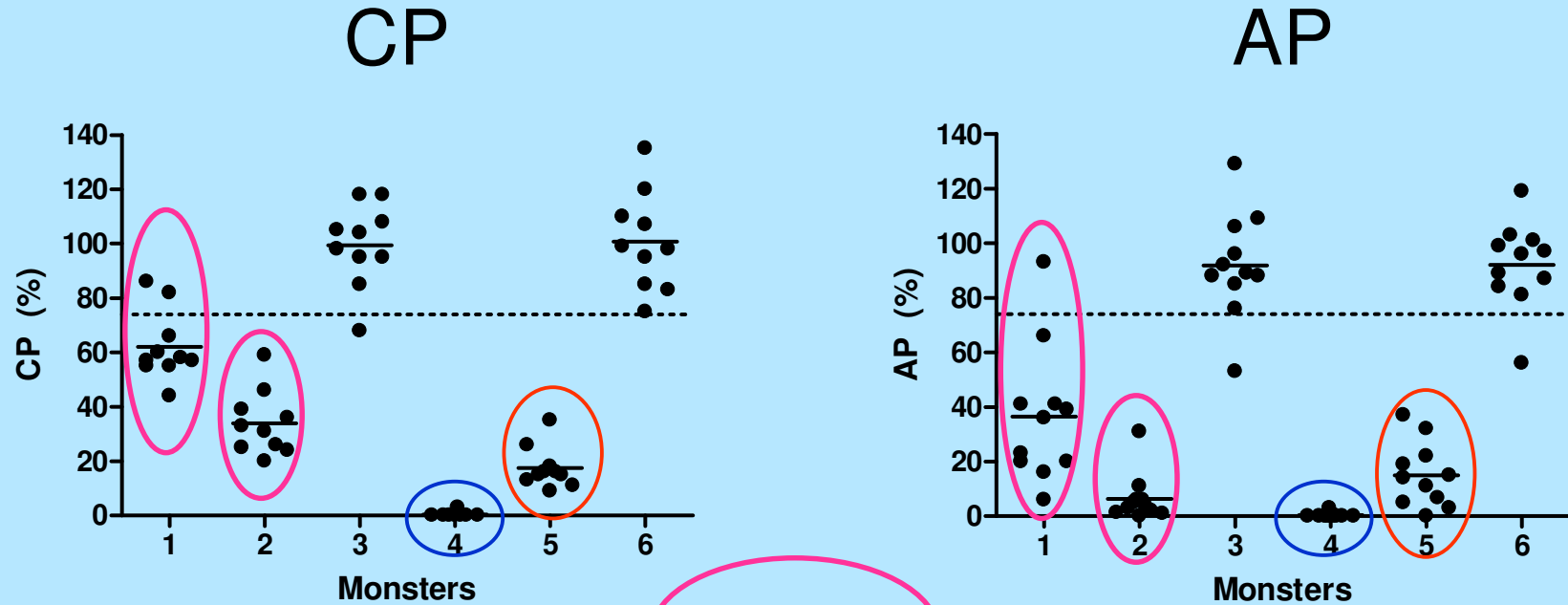
CV (%) 21 35 15 44 18

AP



72 22 83 18

# Klassieke en alternatieve route: Resultaten rondzending 2008



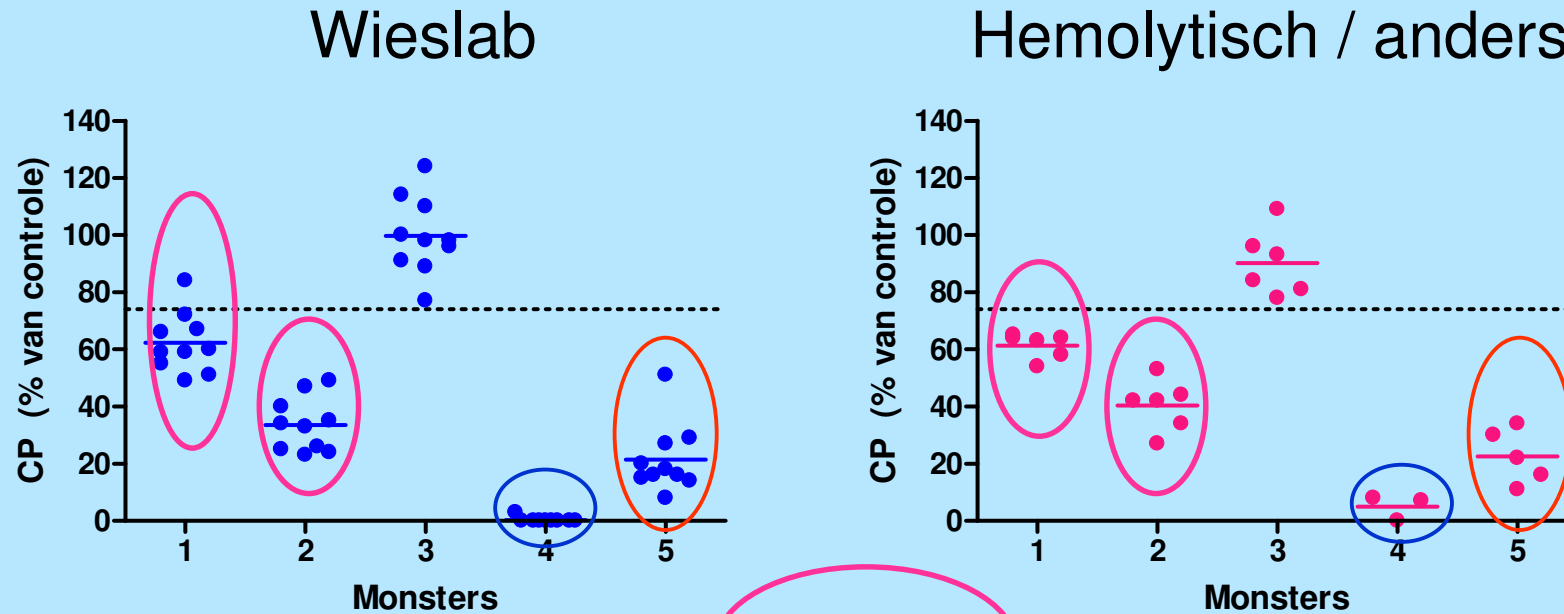
SLE

Cryoglobulinemie (*plasma*)

Leverfalen



# Relatieve waarden CP rondzending 2008

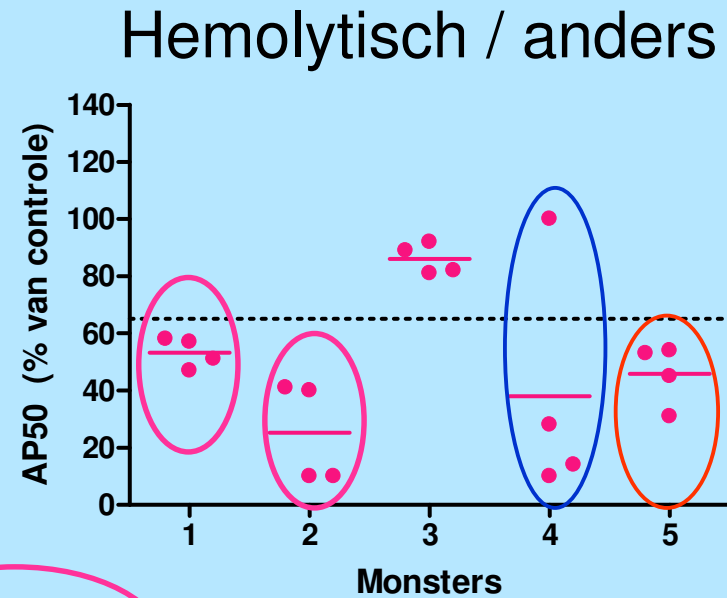
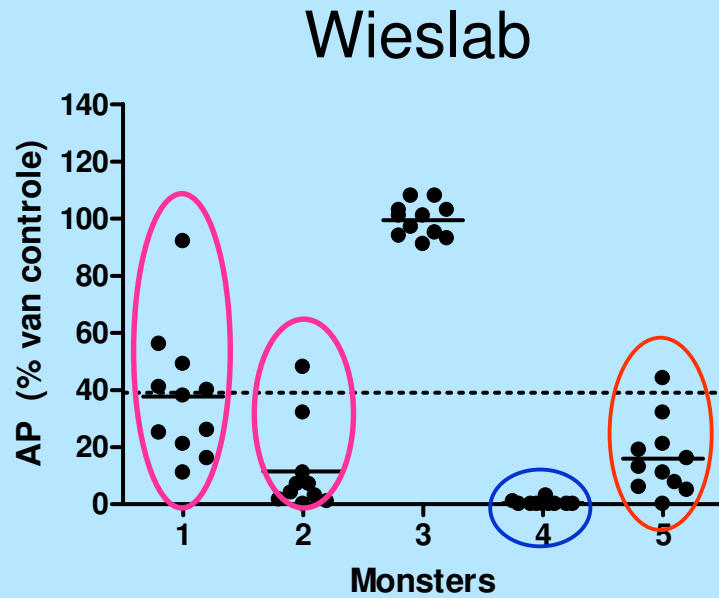


SLE

Cryoglobulinemie (*plasma*)

Leverfalen

# Relatieve waarden AP rondzending 2008

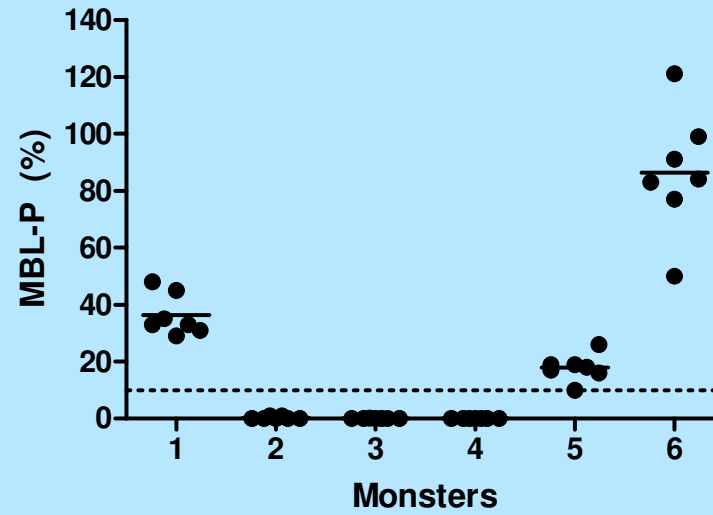


SLE

Cryoglobulinemie (*plasma*)

Leverfalen

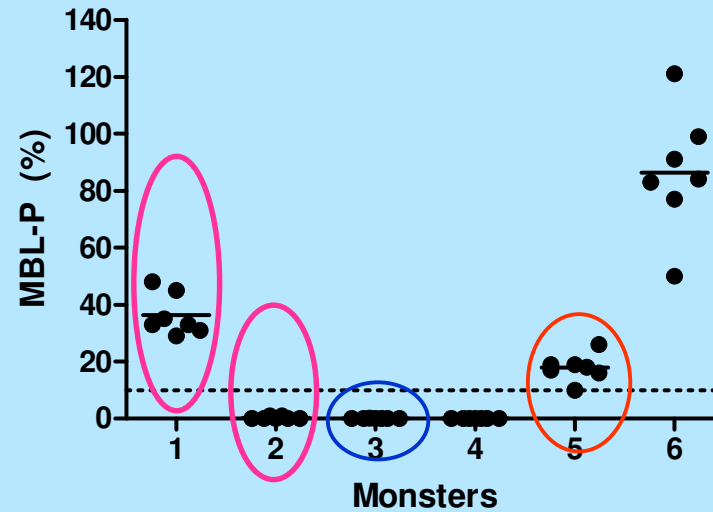
# MBL route: rondzending 2008



CV (%) 20

27 25

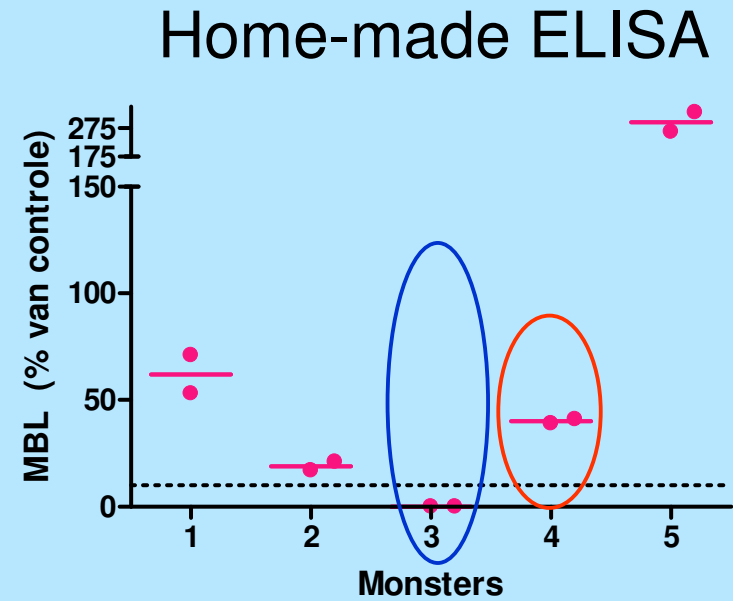
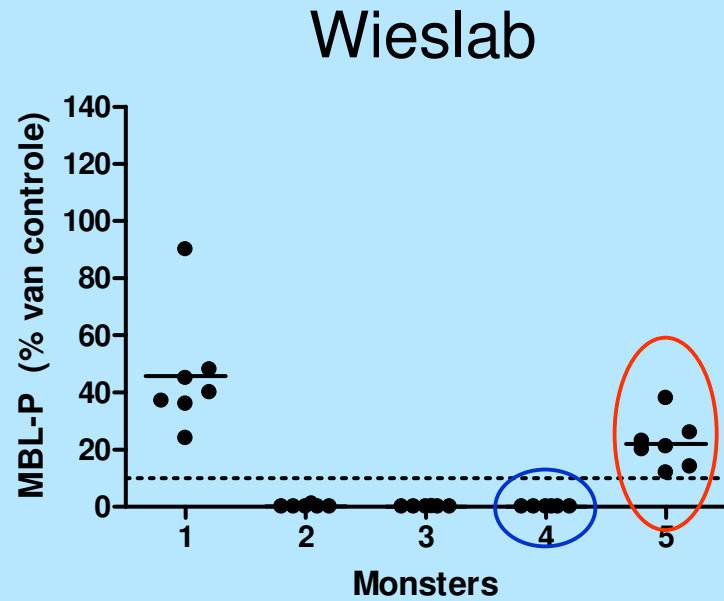
# MBL route: rondzending 2008



SLE

MBL deficientie (*BB genotype*)

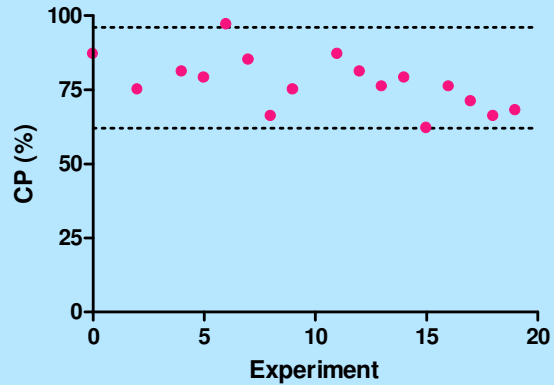
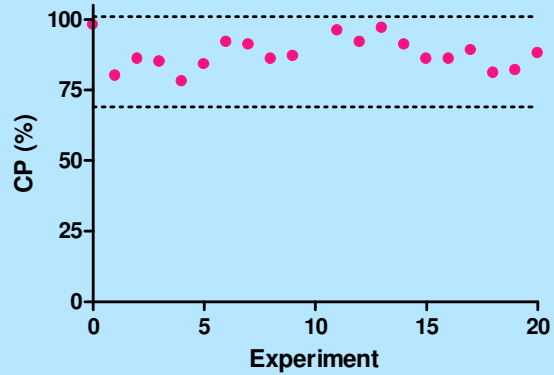
Leverfalen



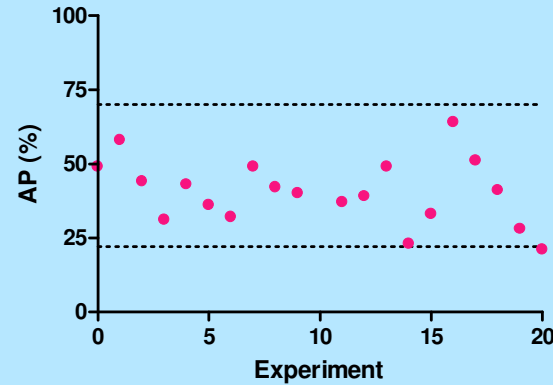
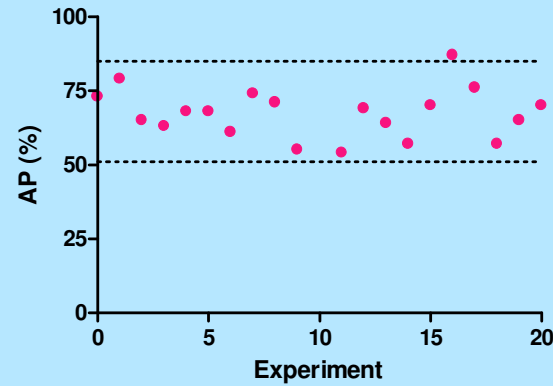
MBL deficiëntie (*BB genotype*)

Leverfalen

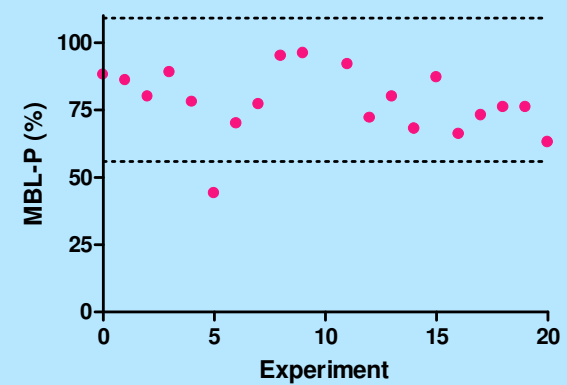
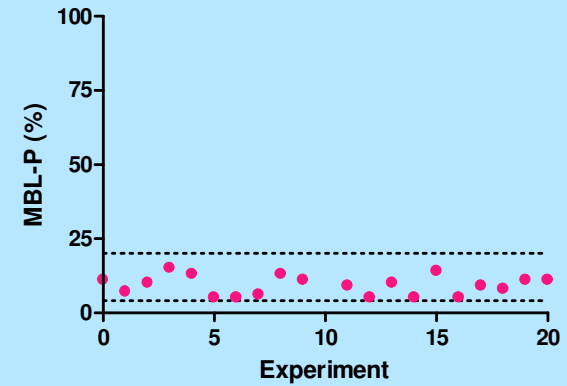
## CP



## AP



## MBL-P



# Functionele complementassays: pitfalls

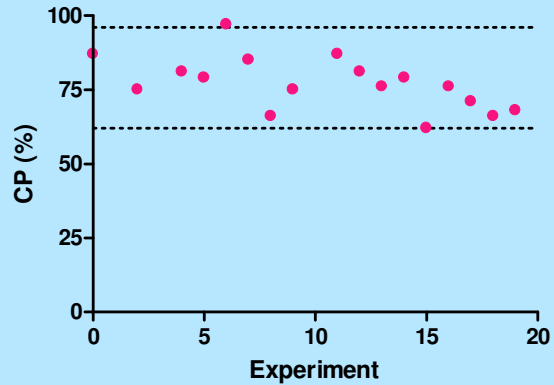
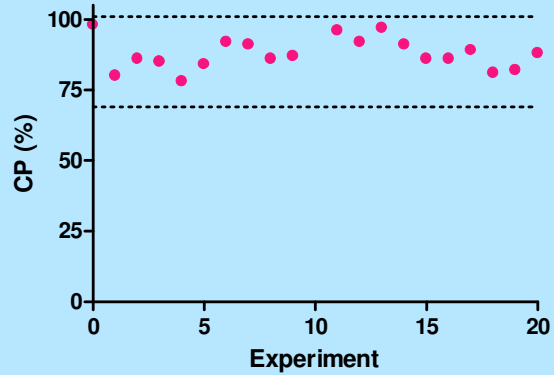
- Complementconsumptie (enzymatische degradatie van complementfactoren) vindt plaats in vivo maar ook in vitro na afname.
- **Monsterkwaliteit is dus cruciaal.** Het effect op de functionele resultaten is afhankelijk van
  - De samenstelling van het monster
  - Het type assay dat wordt ingezet voor functiemetingen
  - Omgang met het monster tijdens de metingen
- Voor de diagnostiek van MBL route deficiënties zijn verschillende assays in gebruik die een verschillend eindresultaat kunnen opleveren.

## Functionele complementmetingen: conclusies

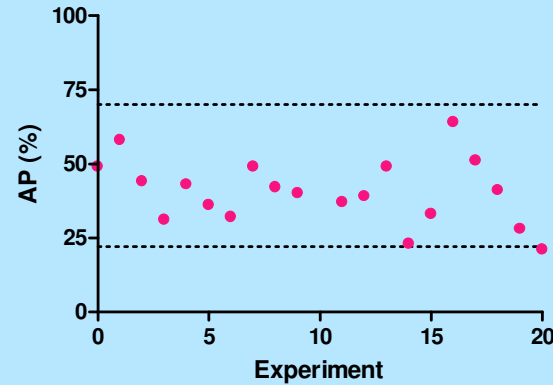
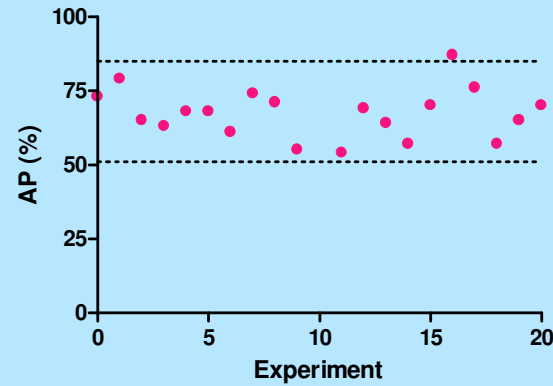
- Met name bij de AP is de spreiding tussen de laboratoria groot, ook wanneer alleen de resultaten van de Wieslabgebruikers worden geanalyseerd.
- Er is een vrije goede overeenstemming betreffende de kwalitatieve uitkomsten
- Bij een aantal monsters is er sprake van onbegrepen uitbijters in de resultaten



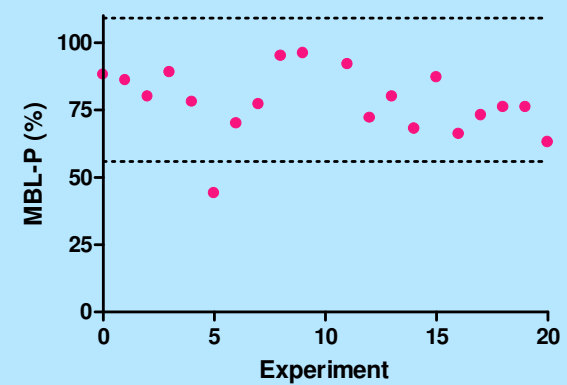
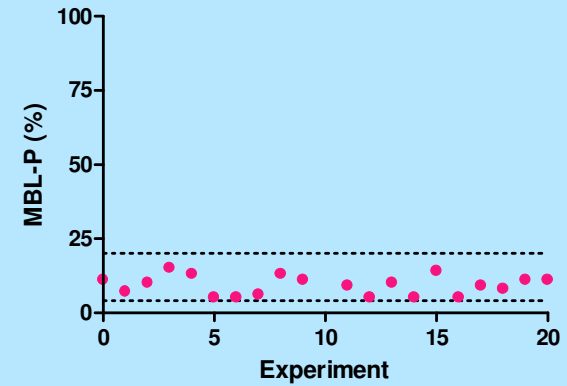
## CP



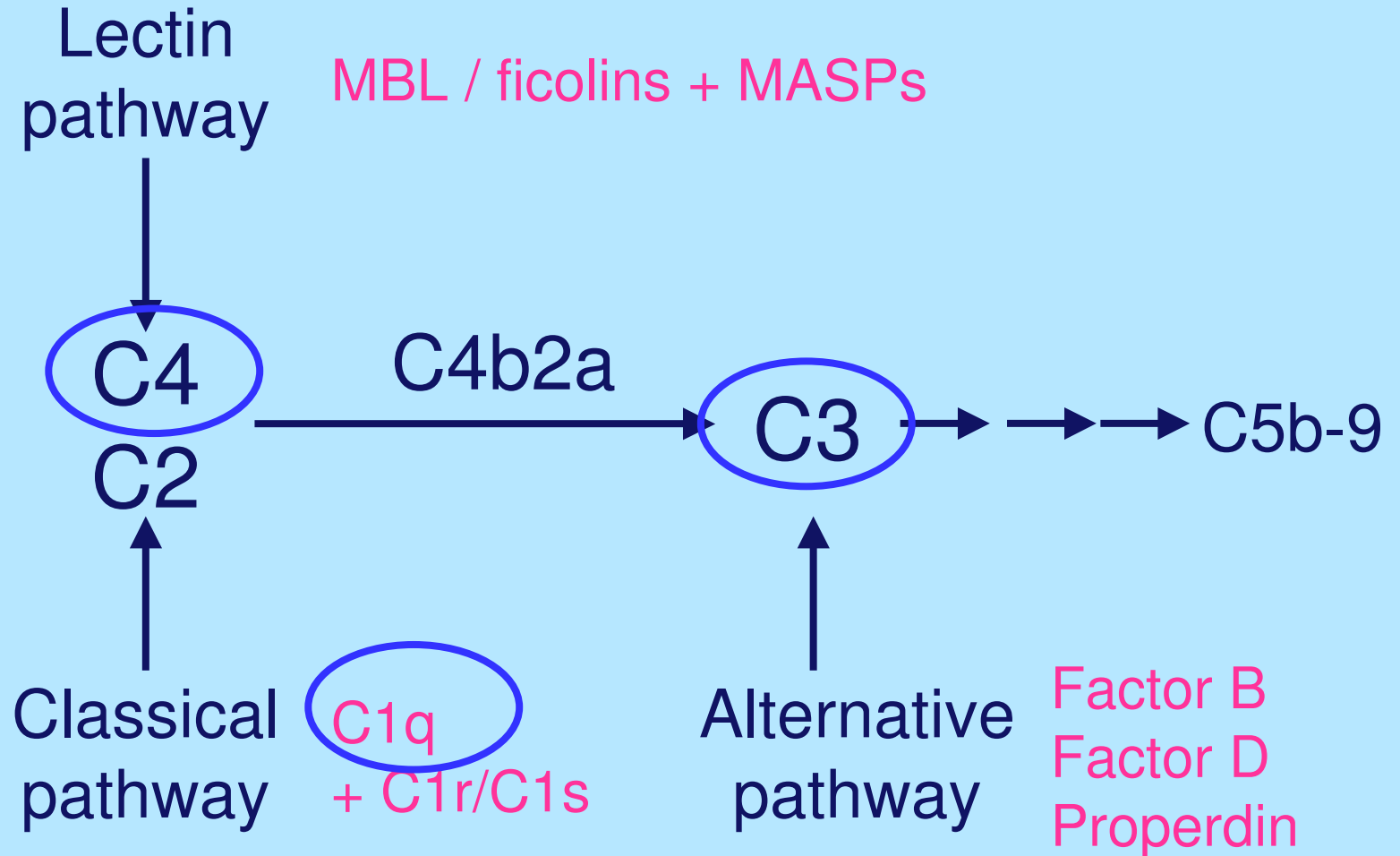
## AP



## MBL-P



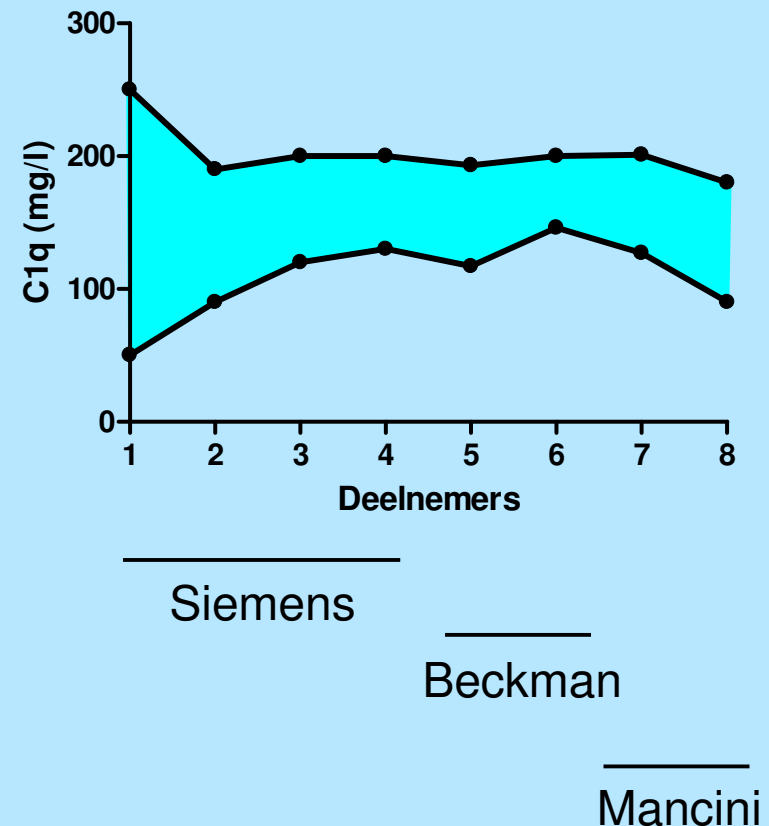
# Activatie van het complement systeem



# Kwantificering van C1q

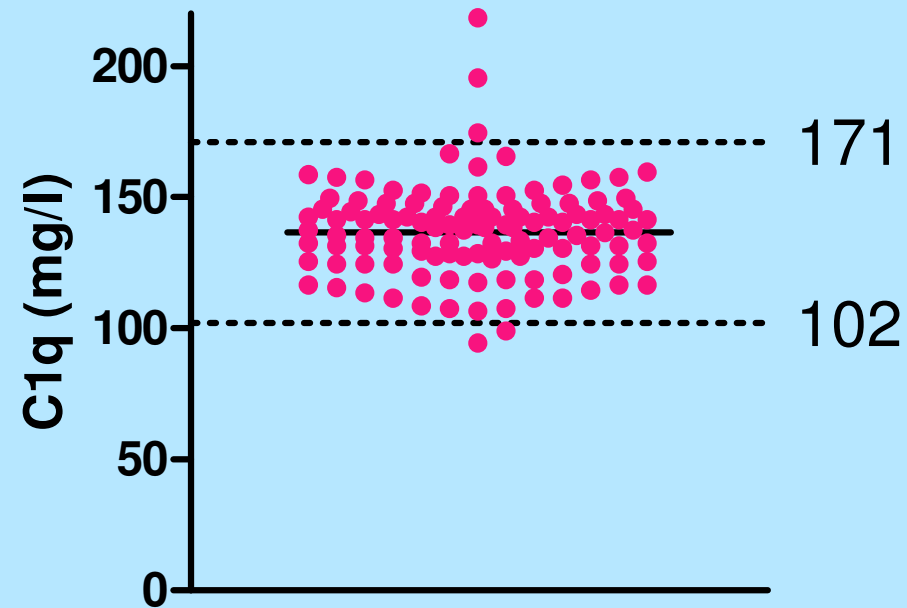
- Aantal deelnemers: 9
- Methoden:
  - Immunonefelometrie Prospec (N = 2)
  - Immunonefelometrie BNII (N = 2)
  - Immunonefelometrie BNII met eigen reagens (N = 1)
  - Immunonefelometrie Beckman (N = 2)
  - Mancini (Siemens (N = 1))
  - Mancini (eigen reagens (N = 1))

## Referentiewaarden

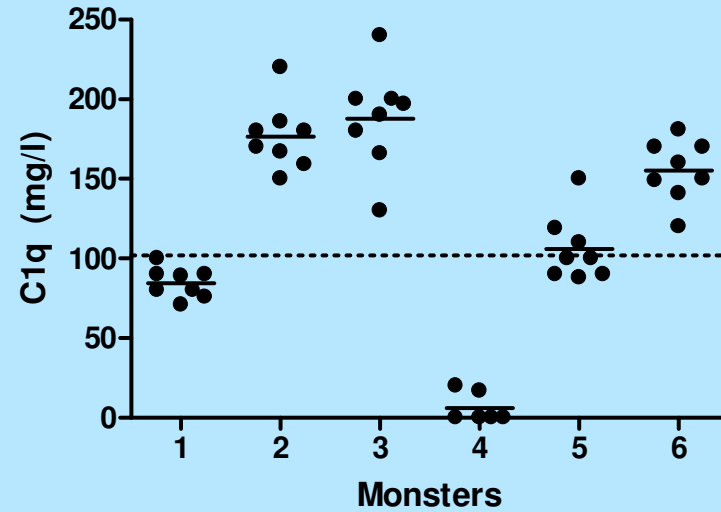
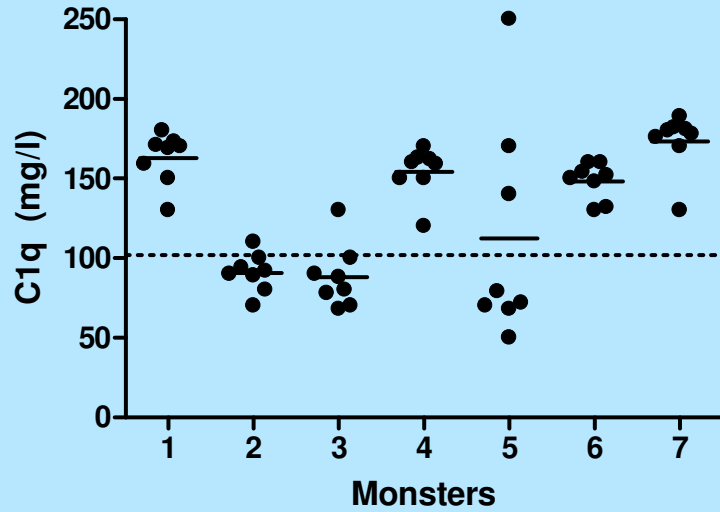


# C1q concentraties in gezonde donoren

Resultaten BN Prospec (N = 120)



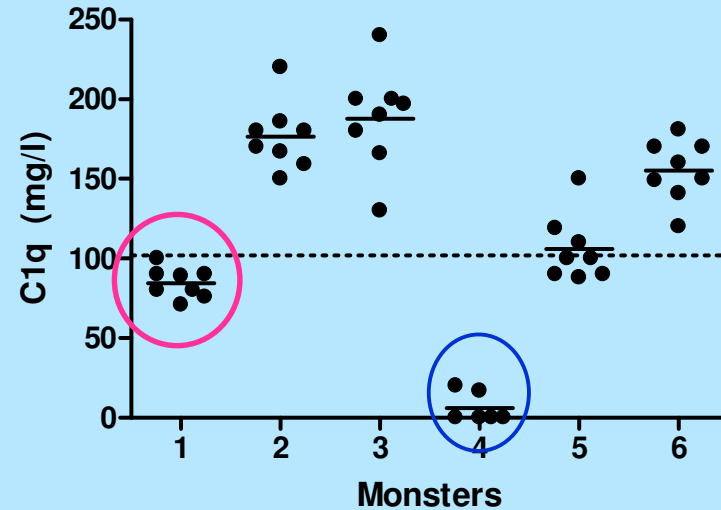
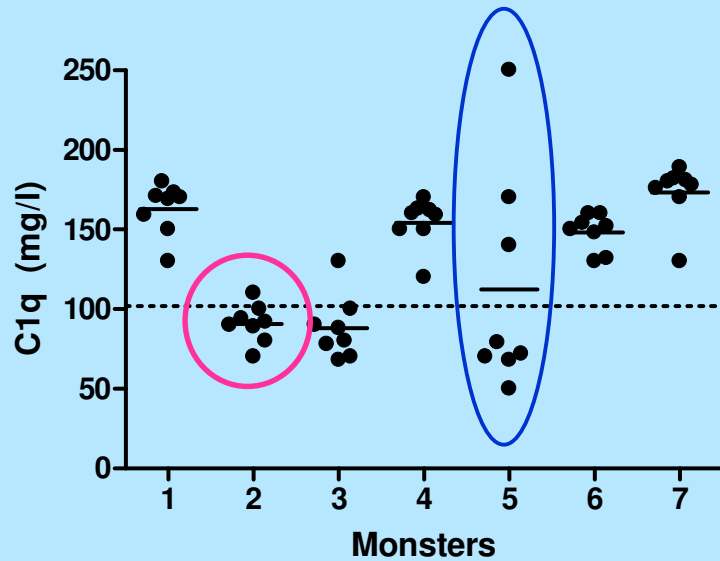
# C1q: resultaten rondzending 2007 / 2008



CV (%) 10 13 23 10 61 8 11

11 12 17 20 13

# C1q: resultaten rondzending 2007 / 2008

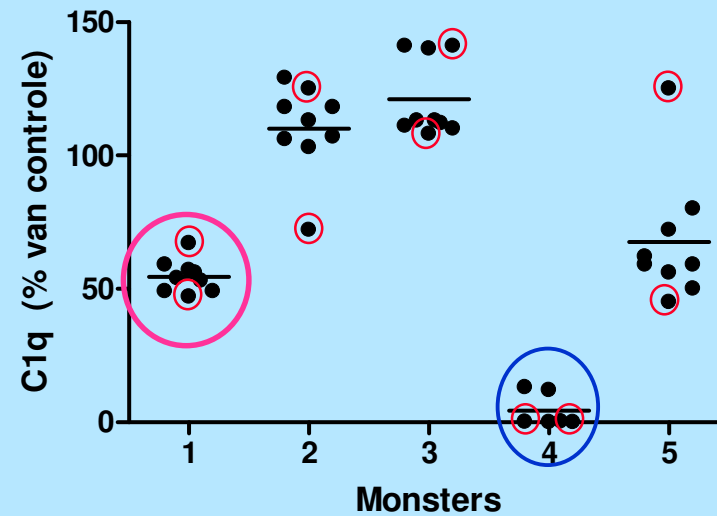
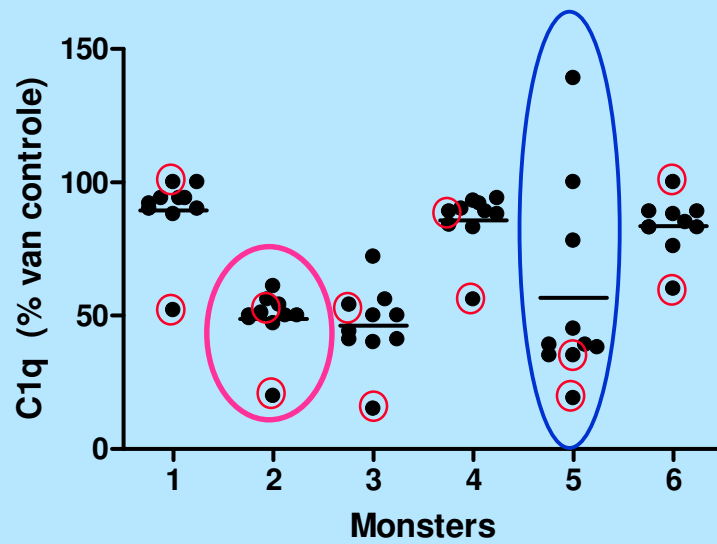


SLE

Cryoglobulinemie

# C1q relatieve waarden

○ Mancini



SLE

Cryoglobulinemie

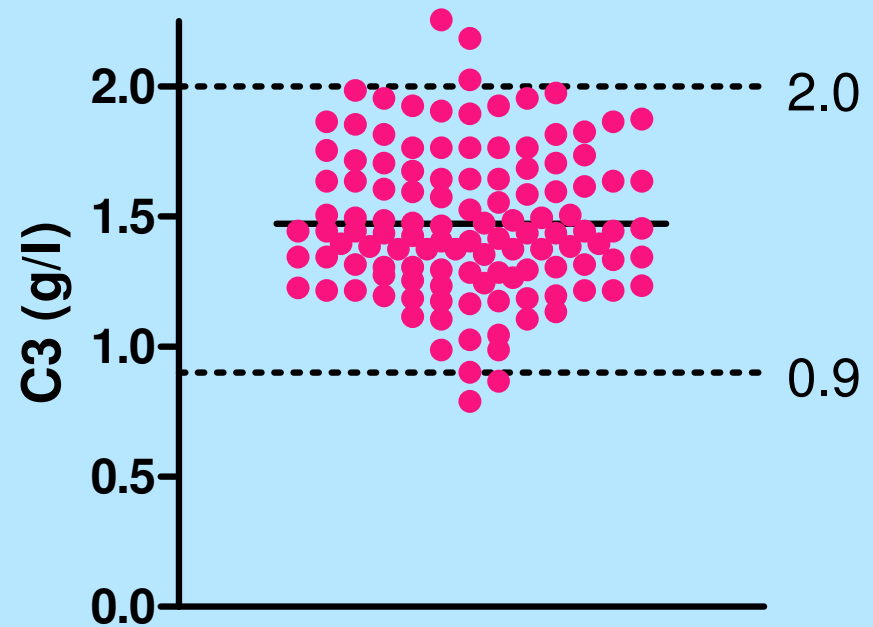
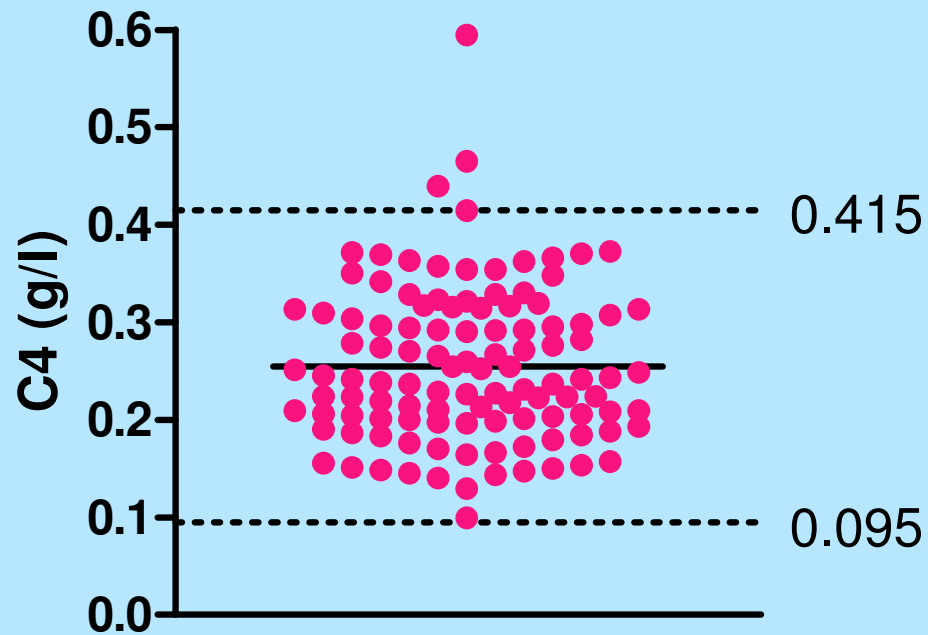
- Interferentie door cryoglobulines en circulerende immuuncomplexen
- Verschillen in detectie tussen intact C1 complex in plasma en vrij C1q in serum?



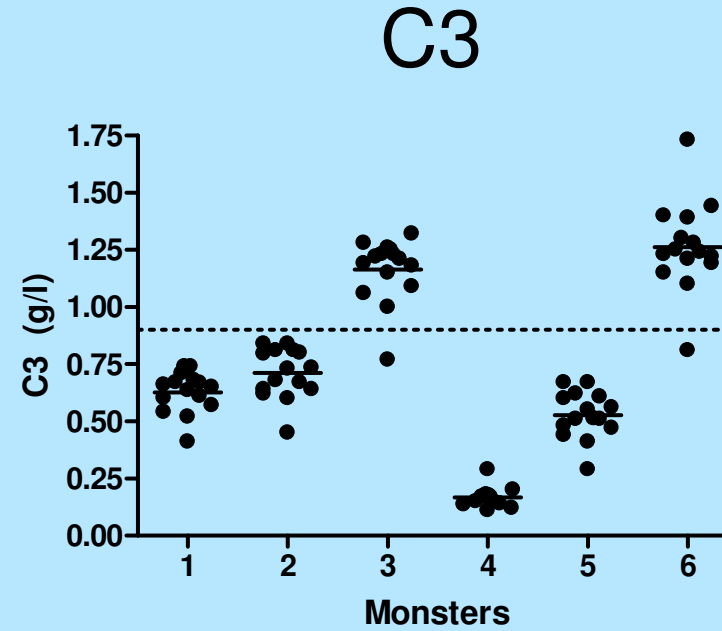
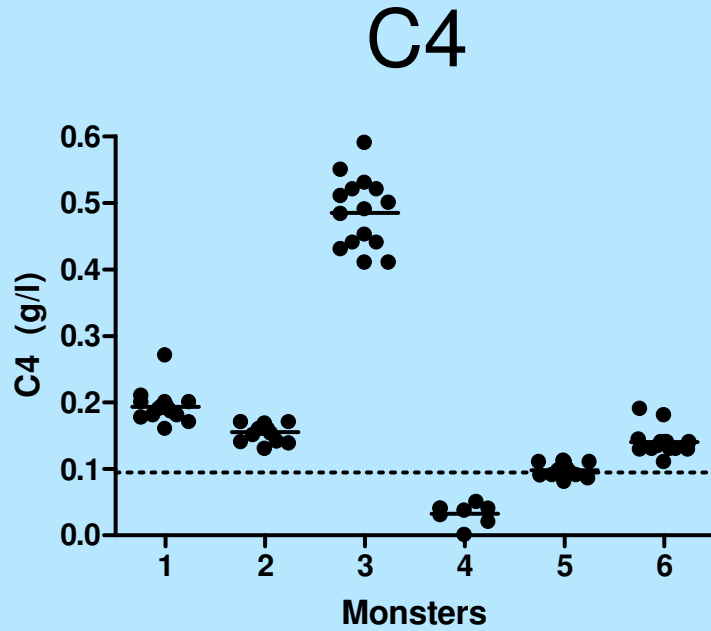
# Kwantificering van C4 en C3

- Aantal deelnemers: 15
- Methoden:
  - Immunonefelometrie Prospec of BNII (N = 8)
  - Immunonefelometrie Beckman (N = 3)
  - Mancini (N = 1)
  - Mancini met eigen reagens (N = 1)
- Referentiewaardenondergrens:
  - 0.1 – 0.2 g/l (C4)
  - 0.47 – 0.90 g/l (C3)

## Resultaten BN Prospec (N = 120)



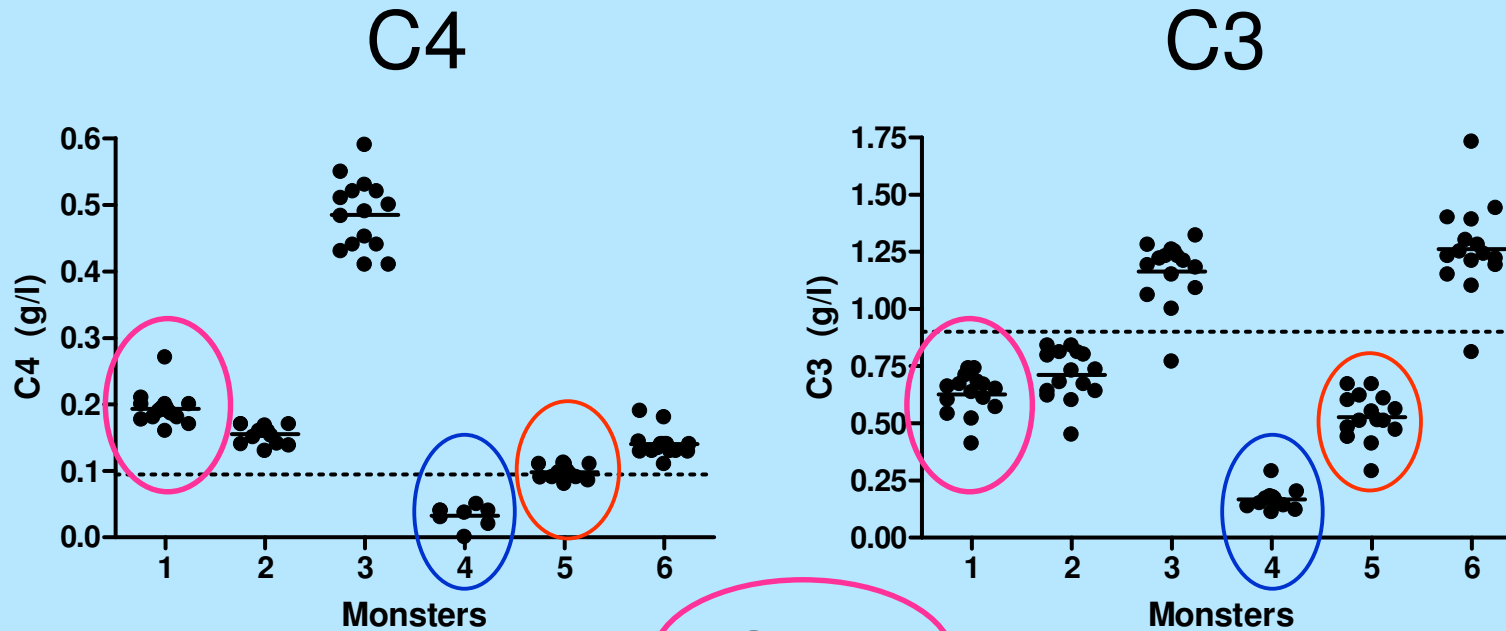
# C4 en C3: resultaten rondzending 2008



CV (%) 13 8 11 10 14

14 16 12 27 19 16

# C4 en C3: resultaten rondzending 2008

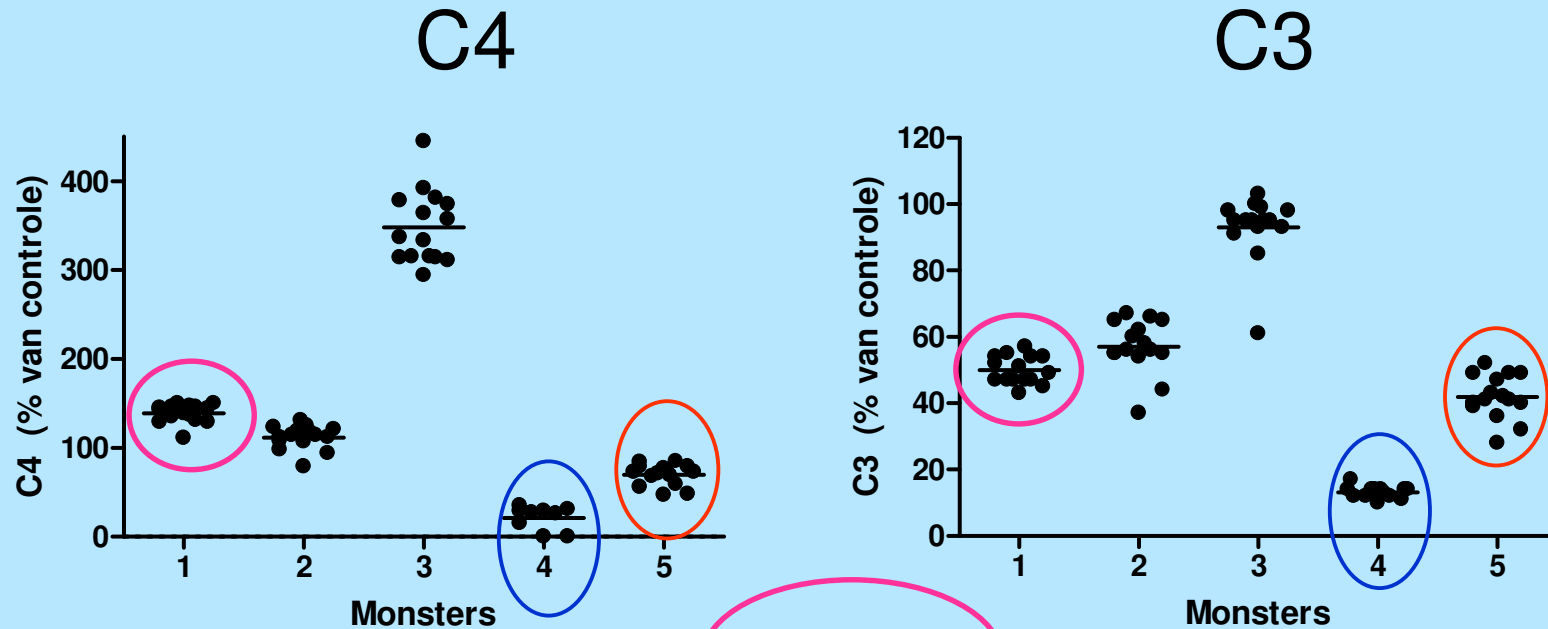


SLE

Cryoglobulinemie

Leverfalen

# C4 en C3 relatieve waarden



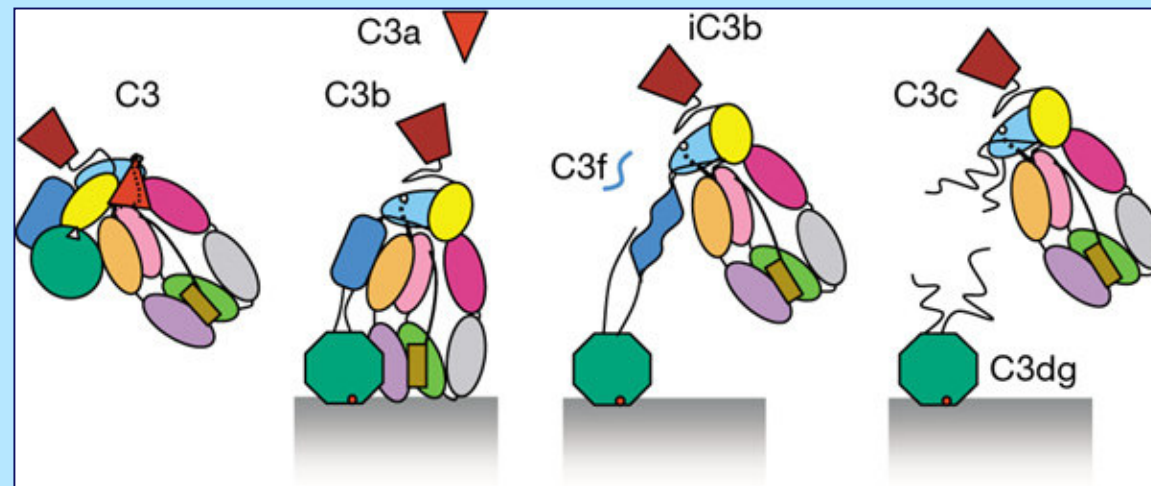
SLE

Cryoglobulinemie

Leverfalen

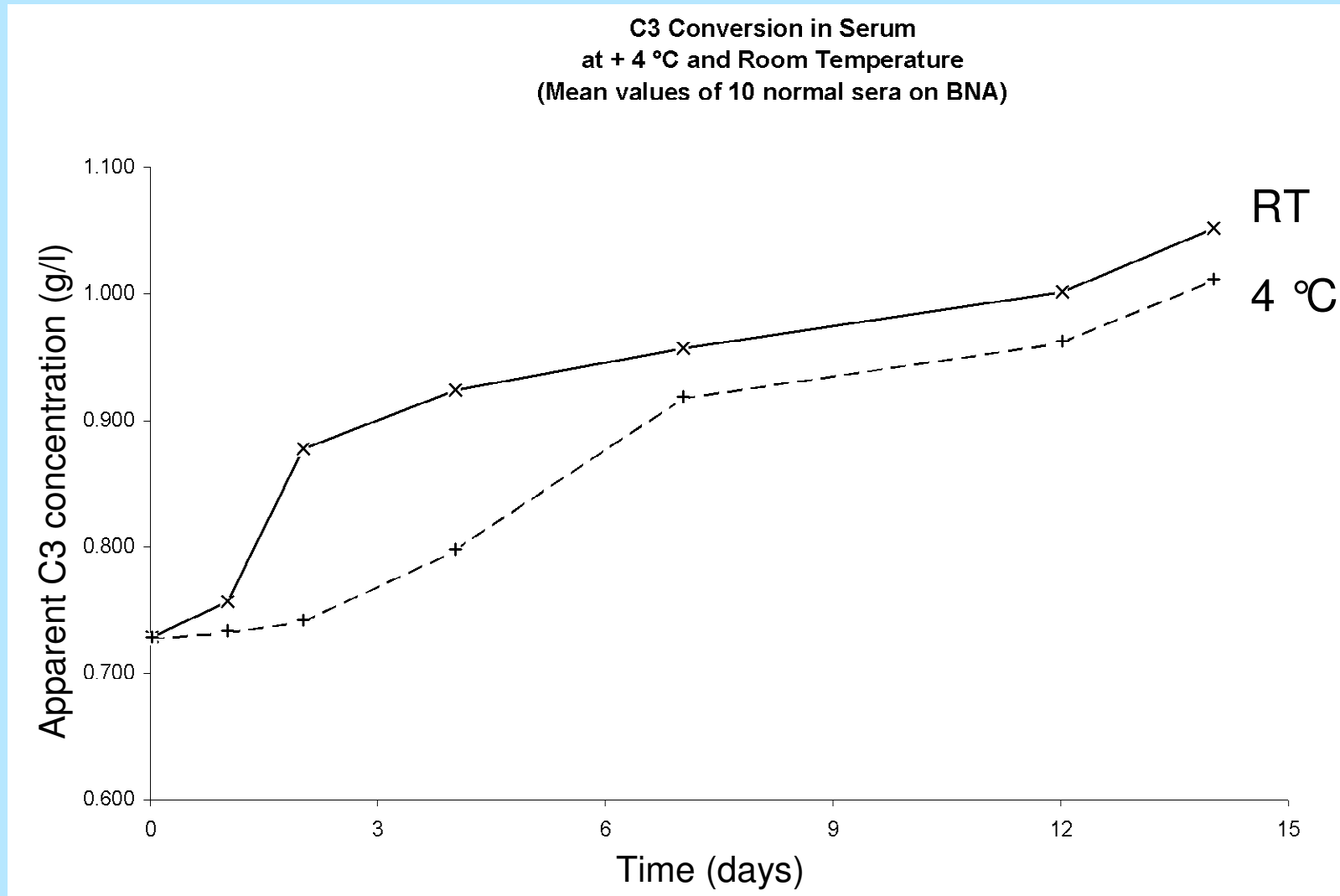
# C4 en C3 kwantificering: valkuilen en interferenties

- Verschillen in detectie tussen genetische varianten van C4 (C4A, C4B)
- Verschillen in detectie tussen activatieproducten van C4 en C3



From: Janssen et al. Nature 2006

# Enzymatische degradatie van C3 in serum: effect op detectie



Data from Siemens (H. Tietema)

# Kwantificering van complementcomponenten: Conclusies

- Nefelometrie is onder de deelnemers aan deze rondzending de meest gebruikte methode
- Gebruik van Mancini komt vrijwel niet meer voor
- Onder de nefelometriegebruikers is de overeenstemming vrij goed met enkele uitbijters
- Cryoglobulines kunnen foutief-verhoogde C1q concentraties opleveren in de nefelometer
- **Er is weinig overeenstemming betreffende referentiewaarden**



# Aanbevelingen

- Traceerbaarheid van de bewaarcondities van de monsters (cruciaal voor de juiste interpretatie van de resultaten)
- Nationale standaardisatie en afstemming van referentiewaarden (wordt ook internationaal aangepakt)
- Ontwikkeling van referentiewaarden voor kinderen

