



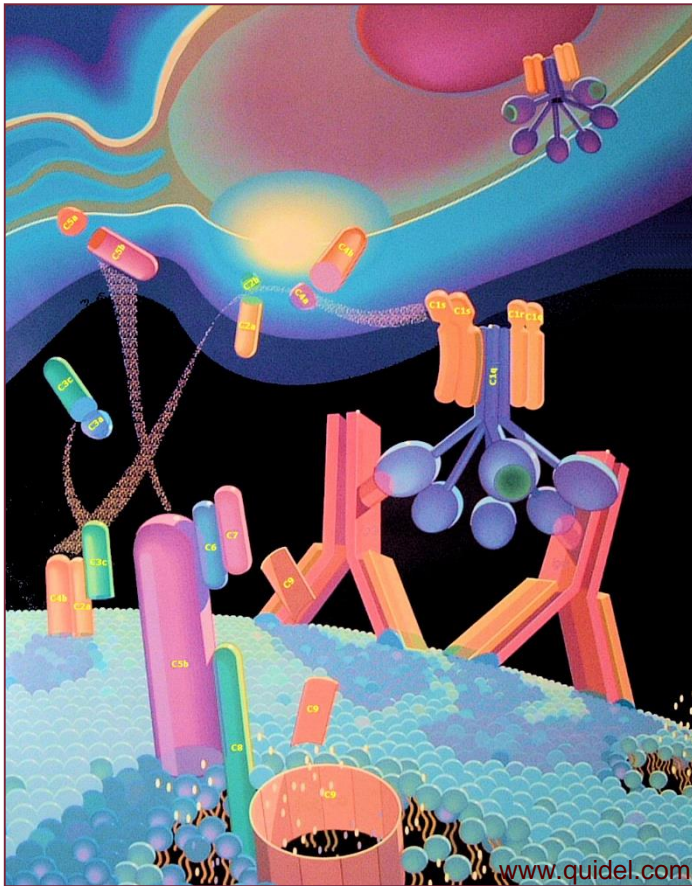
Complement diagnostiek en rondzending

Dr Kyra A. Gelderman

Laboratoriumspecialist medische immunologie

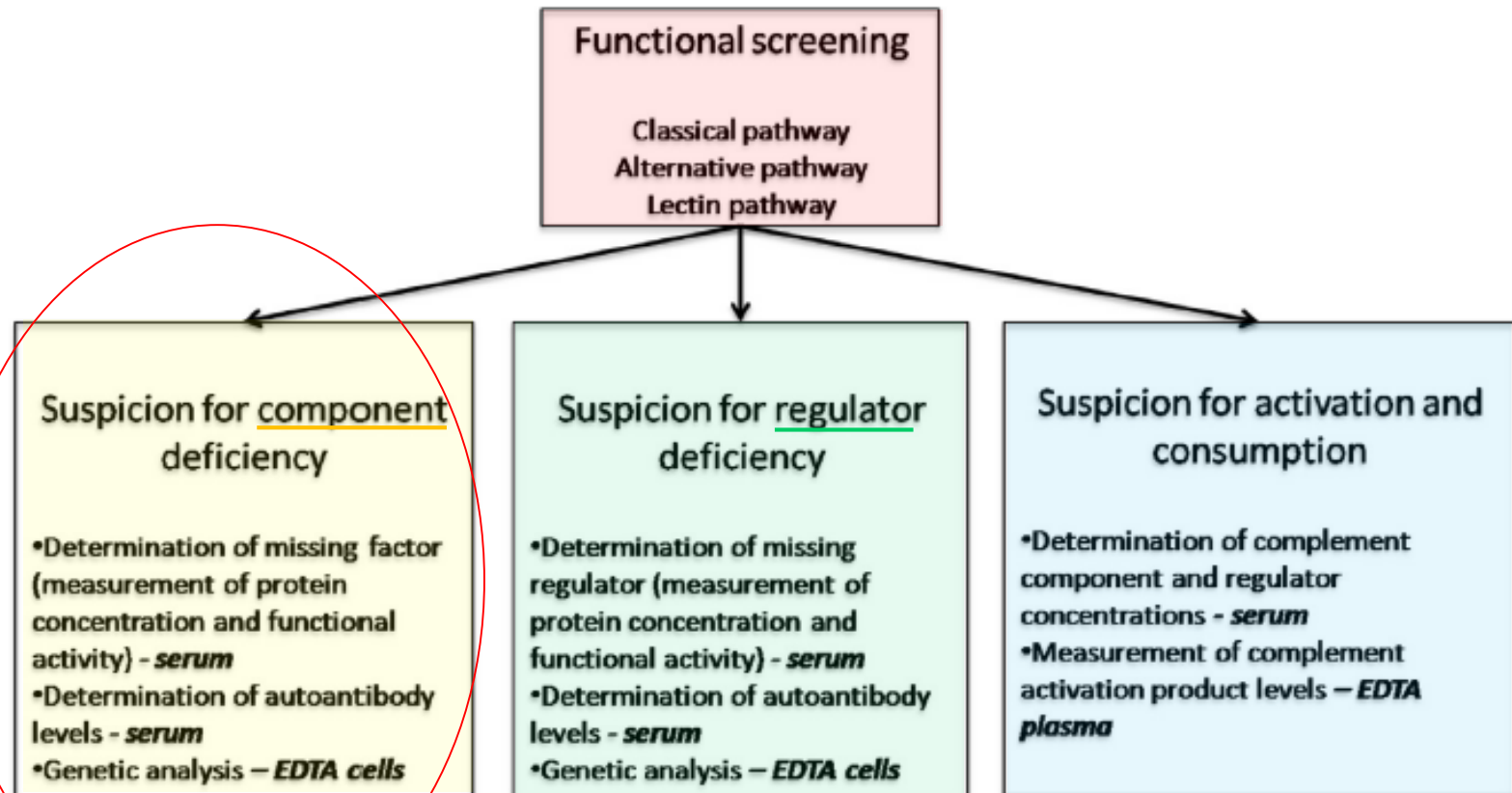
Immunopathologie en bloedstolling, Sanquin Diagnostiek B.V.

Indicaties C-diagnostiek



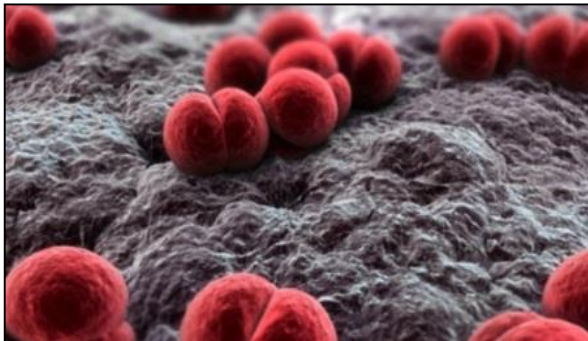
1. Aangeboren en verkregen complement deficiënties
2. Afwijkingen met complement activatie
3. Drug monitoring

Diagnostic algorithm



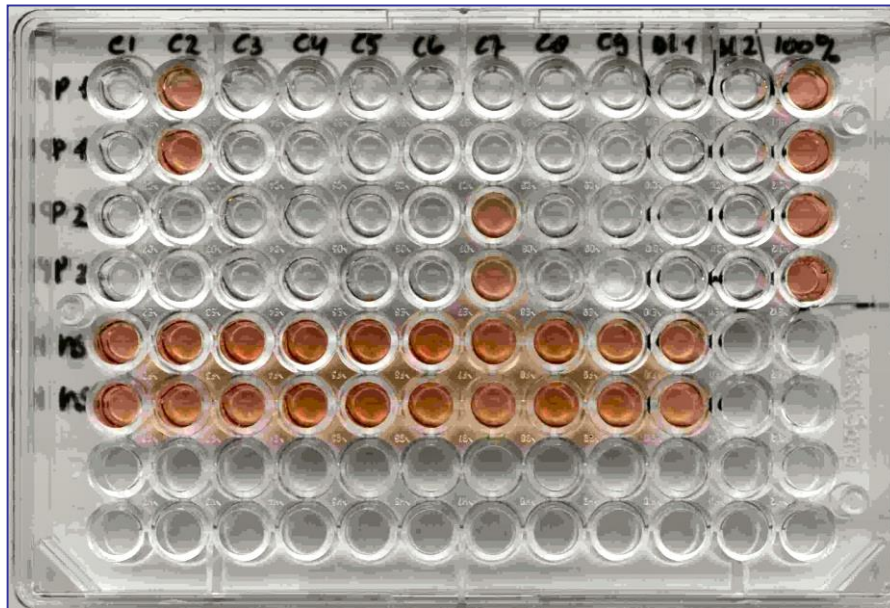
Terminal pathway deficiency

- Deficiency in terminal pathway factors (C5 t/m C9) →
no Membrane Attack Complex (C5b-9)
- Increased susceptibility for infection with *Neisseria meningitidis*
- Encapsulated bacteria difficult to phagocytose
→ lysis by MAC required for clearance

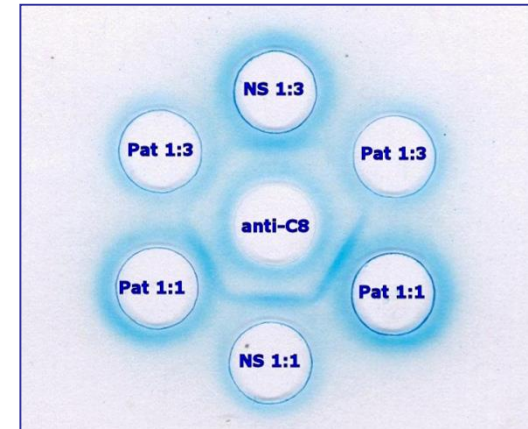


Complement deficiencies

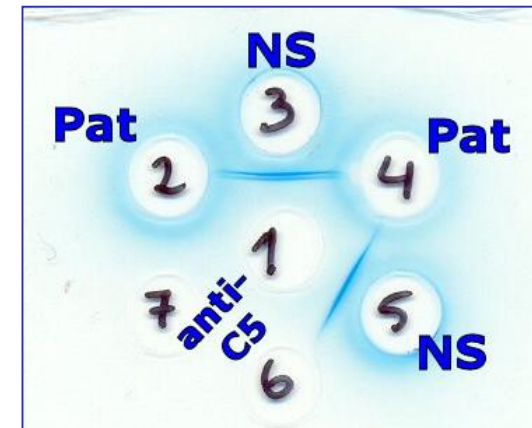
1. Screening pathways activity (<)
2. Absence/presence of factors/inhibitors



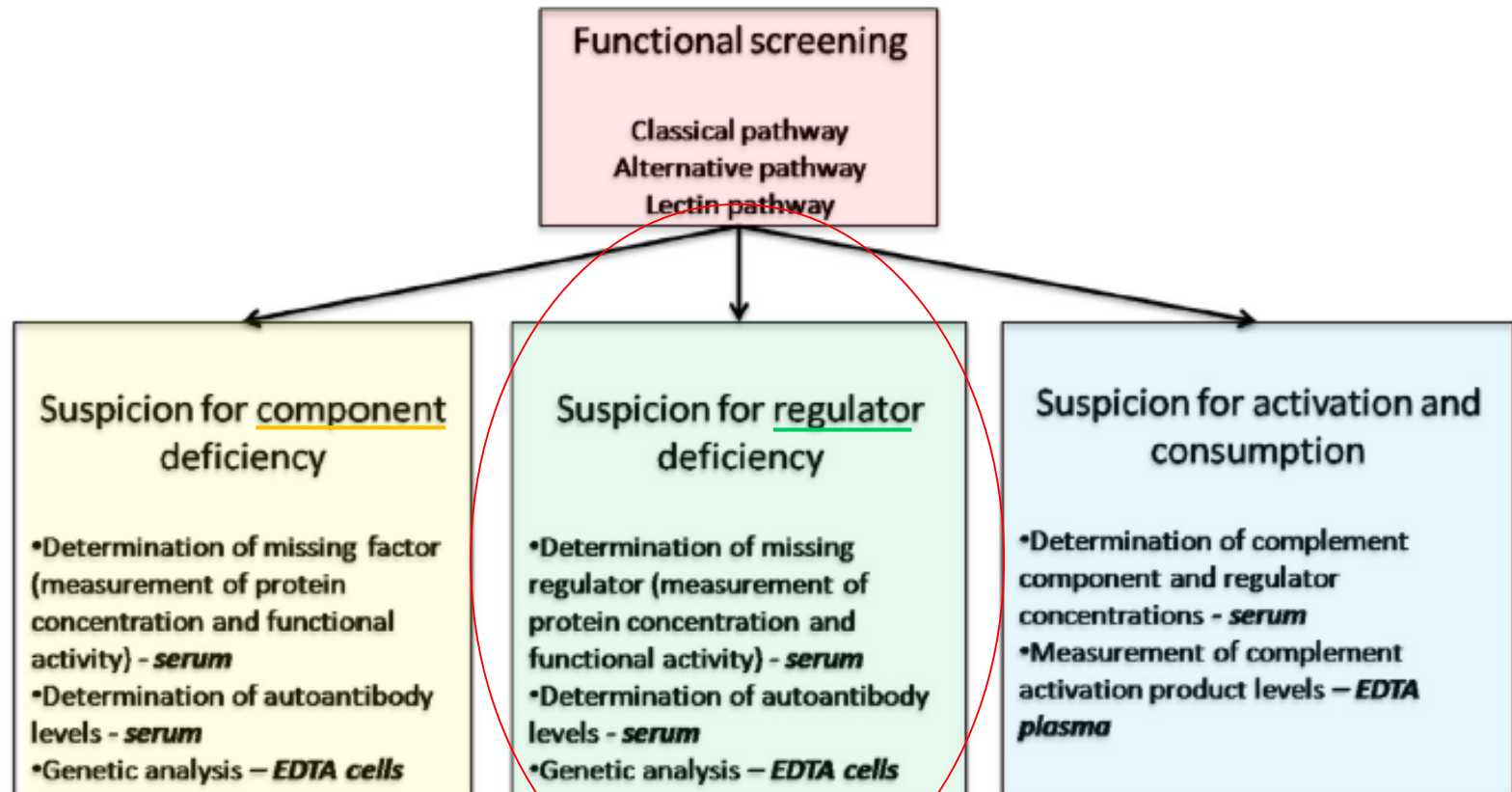
Reconstitution experiments



Ouchterlony



Diagnostic algorithm



Angiooedeem

- Subcutaneous and submucosal swelling in any part of the skin / gastrointestinal tract / respiratory tract
- Hereditary form / acquired form



Type I HAE: low protein levels (5 – 30% of normal)

Type II HAE: normal protein levels, dysfunctional (~20%)

Low C4

Low C1 inhibitor activity

(low C1 inhibitor antigen concentration)

! Storage of plasma/serum at 4°C will lead to activation and lower C1 inhibitor activity

Type III HAE: normal C1-inhibitor antigen and function, normal C4, gain of function mutations in FXII (genetic testing)

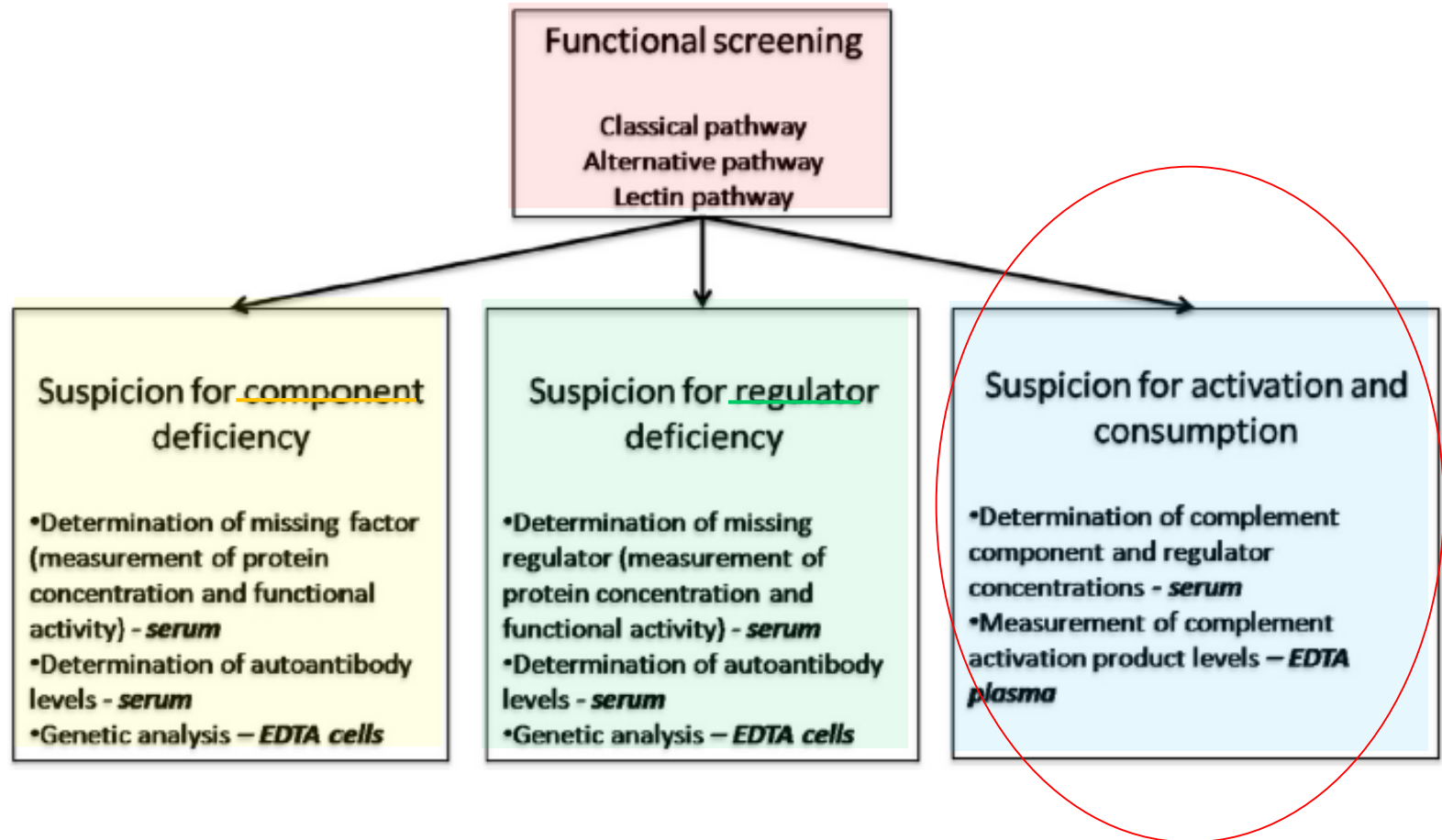


- C1-inhibitor function
- C1-inhibitor antigen concentration
- C4 concentration
- C1q concentration
- C1 inhibitor autoantibody (levels, function)
- *F12* mutation analysis
- *SERPING1* mutation analysis

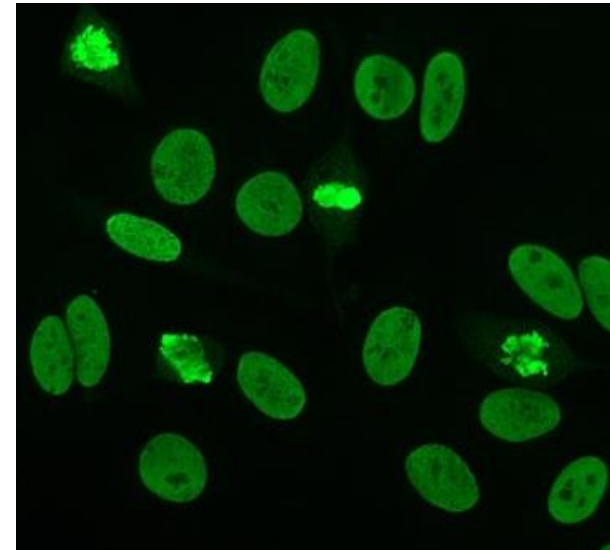
Diagnostic outcomes

Type	Disorder	C1-INH		C4	C1q	Ab	Mutation	
		function	antigen				<i>SERPING1</i>	<i>F12</i>
acquired (<i>AAE</i>)	IH	=	=	=	=	No	No	No
	InH	=	=	=	=	No	No	No
	ACEI	=	=	=	=	No	No	No
	Type I	↓	↓	↓	↓	No	No	No
	Type II	↓	↓/=	↓	↓	Yes	No	No
hereditary (<i>HAE</i>)	Type I	↓	↓	↓	=	No	Yes	No
	Type II	↓	N/↑	↓	=	No	Yes	No
	FXII	=	=	=	=	No	No	Yes
	U (type III)	=	=	=	=	No	No	No

Diagnostic algorithm



- Chronische autoimmuunziekte
- Kan bijna elk orgaan beïnvloeden
- Vaak autoantistoffen tegen kern antigenen (ANA)
- Soms maar paar kenmerken
- Breed spectrum van klachten (renal, huid, neuropsychiatrisch, artralgie, cardiaal, Raynaud, gastroïntestinaal, vasculitis etc)
- Ook vaak gelijkenis met hematologische ziekte, andere AIZ, infectie etc



→ Lastige diagnose

Vaak gebaseerd op labdiagnostiek en uitsluiten andere mogelijkheden

Criteria (SLICC, classification criteria)

SLICC[†] Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus

Requirements: ≥ 4 criteria (at least 1 clinical and 1 laboratory criteria)
OR biopsy-proven lupus nephritis with positive ANA or Anti-DNA

Clinical Criteria

1. Acute Cutaneous Lupus*
2. Chronic Cutaneous Lupus*
3. Oral or nasal ulcers *
4. Non-scarring alopecia
5. Arthritis *
6. Serositis *
7. Renal *
8. Neurologic *
9. Hemolytic anemia
10. Leukopenia *
11. Thrombocytopenia ($<100,000/\text{mm}^3$)

Immunologic Criteria

1. ANA
2. Anti-DNA
3. Anti-Sm
4. Antiphospholipid Ab *
5. Low complement (C3, C4, CH50)
6. Direct Coombs' test (do not count in the presence of hemolytic anemia)

[†]SLICC: Systemic Lupus International Collaborating Clinics

* See notes for criteria details

C3 en C4 (en C1q) serum concentratie

C3 en C4 levels zijn een reflectie van

- Aanmaak (lever, acute fase respons)
- Verbruik (complement activatie)

Normaalwaarde intervallen C3 en C4 zijn breed:

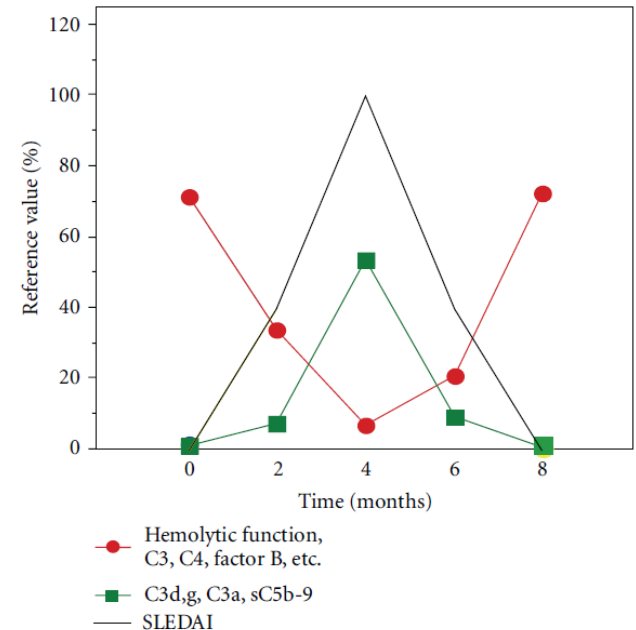
C3 0,9 – 1,8 g/L

C4 0,150 – 0,400 g/L

Een daling kan onopgemerkt blijven!

Verbruik kan gemeten worden met complement activatie producten

C3d, sC5b-9 (C5a, C3a)





Waarde complement concentraties in SLE

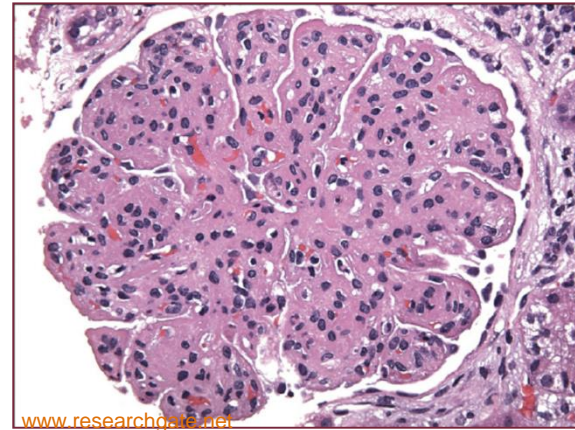
	<u>C1q</u>	Verlaagd <u>C3</u>	<u>C4</u>
Spec	96%	81%	83%
Sens	20%	78%	80%

Diagnosis?

Patient with slight proteinuria.

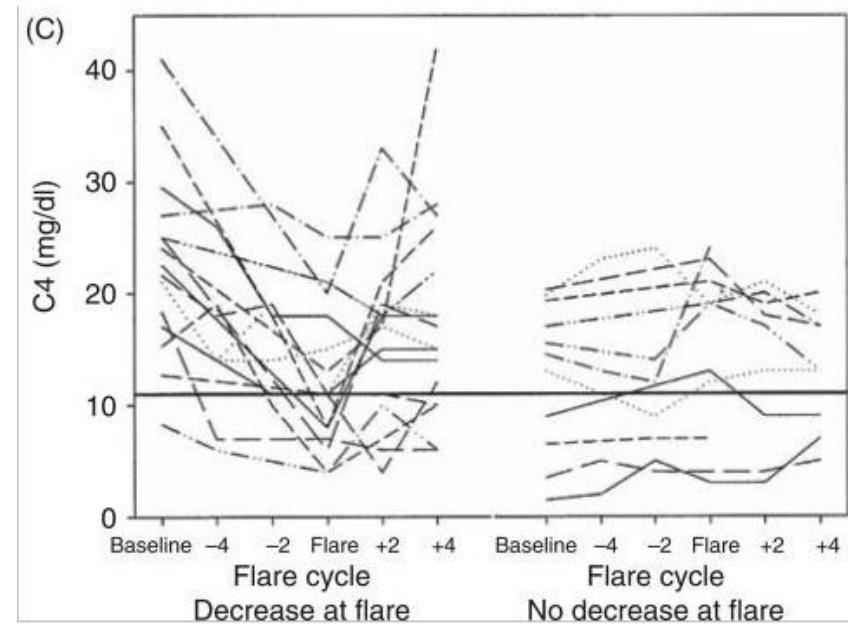
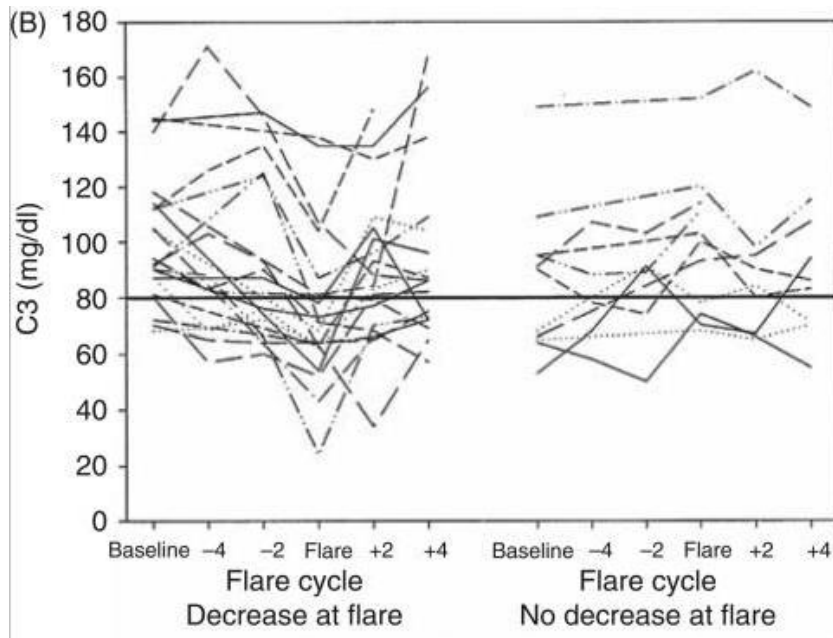
C3 concentration was requested and determined and was 0.5 g/L (↓)

- DDD
- aHUS
- SLE
- Post-streptococcal GN
- Cryoglobulinemia
- All of these



C3 en C4 en ziektebeloop

C3 and C4 decrease at flare, but may not predict flare





- Jongen uit 2003
- Zwelling, 1-malig
- Verdenking angiooedeem
- C1-INH activiteit normaal 0,88 (0,68-1,28 U/ml)
C4 verlaagd 100 (150-400 mg/L)
C3 normal 0,91 (0,90-1,8 g/L)

C4 concentratie varieert heel erg:

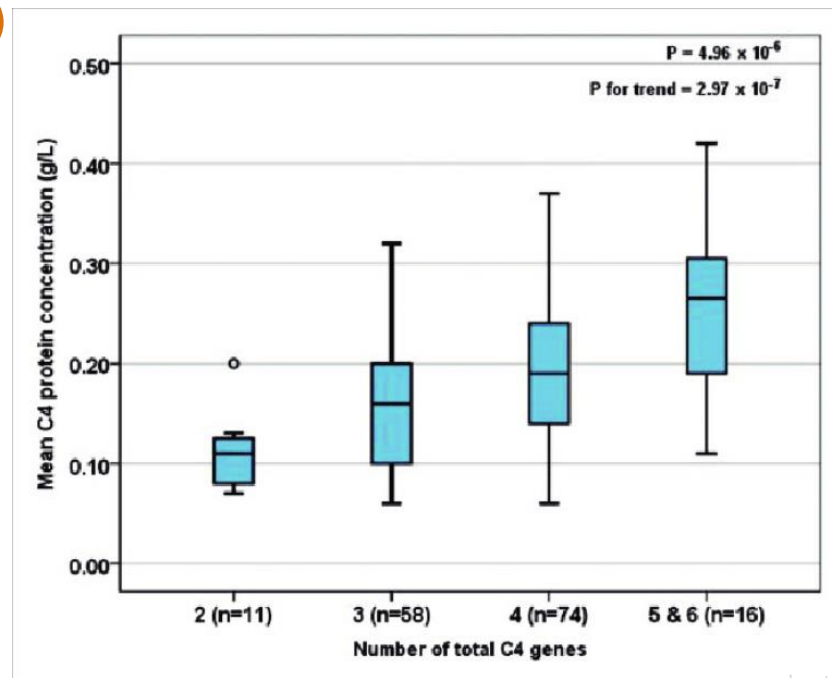
CNV: 0-8 genen (deleties/duplicaties)

Deficiëntie C4 associeert sterk met SLE, lage levels op zichzelf niet

2 soorten C4

C4A (Rogers) bindt vnl vrije amino groepen → bindt goed aan antistoffen

C4B (Chido) bindt vnl hydroxyl groepen → bindt goed aan bacteriën

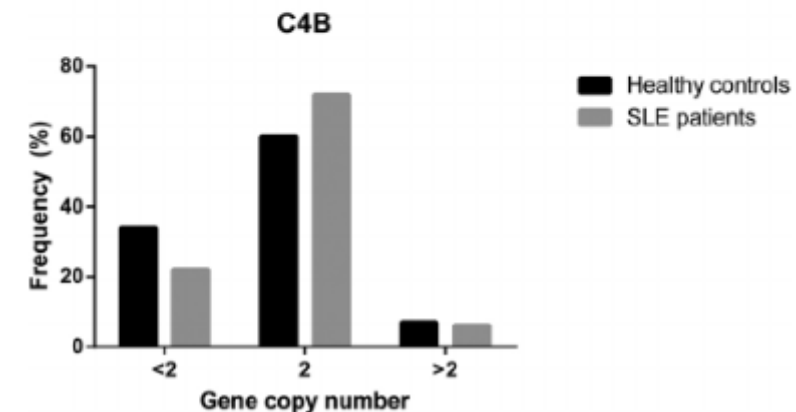
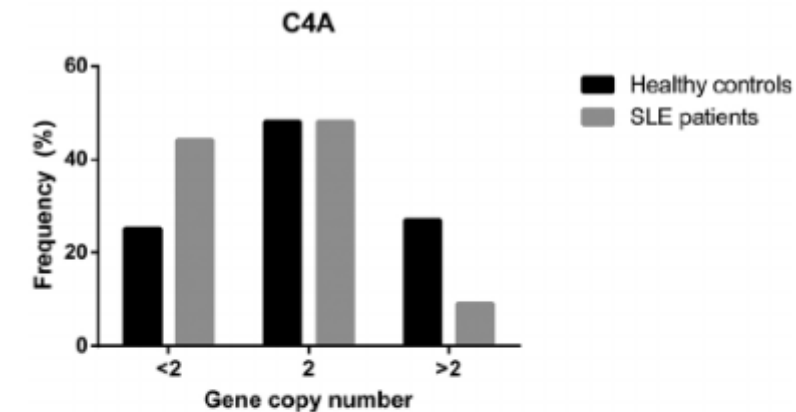
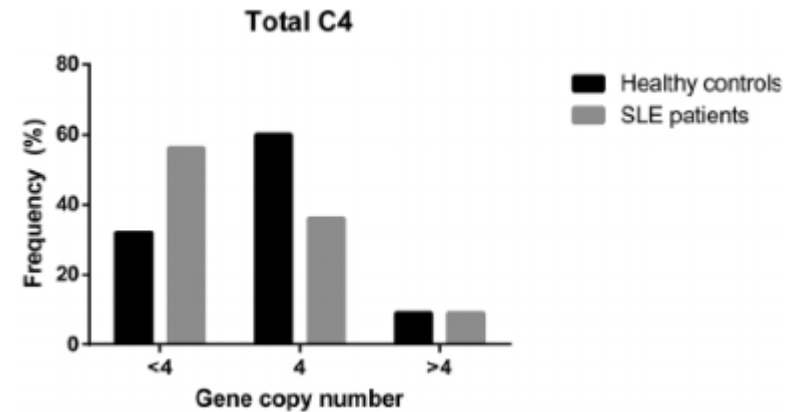


C4A en C4B

- Verhoogde kans op SLE als laag CVN voor C4A
- Associatie van laag C4A CNV met serositis (maar niet in andere studies)

Is het beter om C4A te meten in SLE?

→ Ontwikkelen functionele test C4A/C4B?



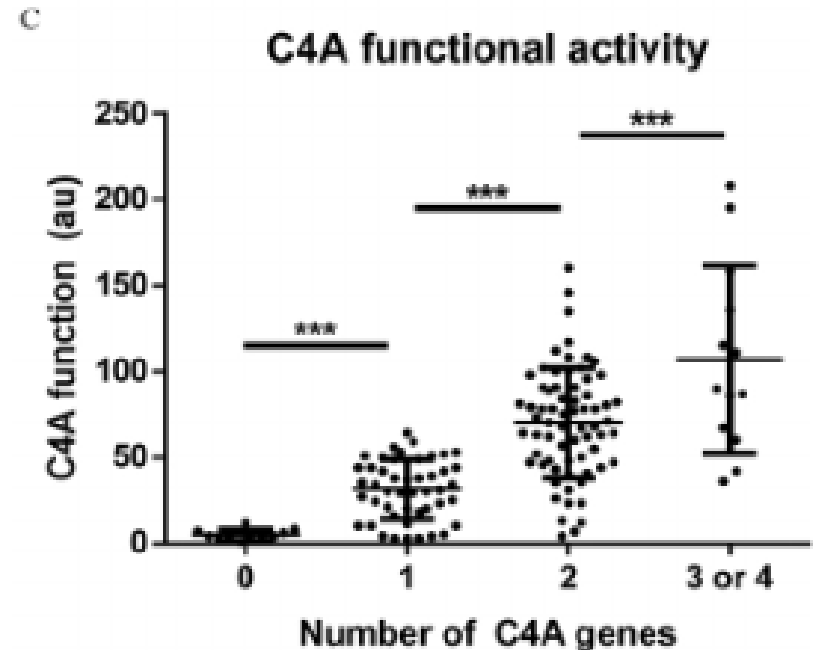
C4A en C4B

- C4 functie correleert heel goed met copy number
- C4 functie is niet verstoord in SLE

Conclusie:

C4A meten is niet perse beter dan C4

Laag C4 kan verklaard worden door C4A deficiëntie, dat is wel geassocieerd met SLE.



Complement-functies

<u>Complement-functies</u>		<u>EDIA-plasma</u>
△ C016	C4-depositie (lectineroute activiteit)	• 2 ml vers serum
△ C010	CH50-titer	△ C011 AP50-titer
△ C012	C3 nephritic factor (C3NeF)	△ C025 sC5b-9 (sTCC)
△ C014	Complementdeficiëntie-onderzoek indien complement-activiteit afwezig	
→ △ C019	C4-polymorfisme	• 2 ml vers serum. Inzending alléén na telefonisch overleg
△ C023	HUS-onderzoek	
△ C020	Factor H	△ C021 Factor H activiteit

Complement diagnostics

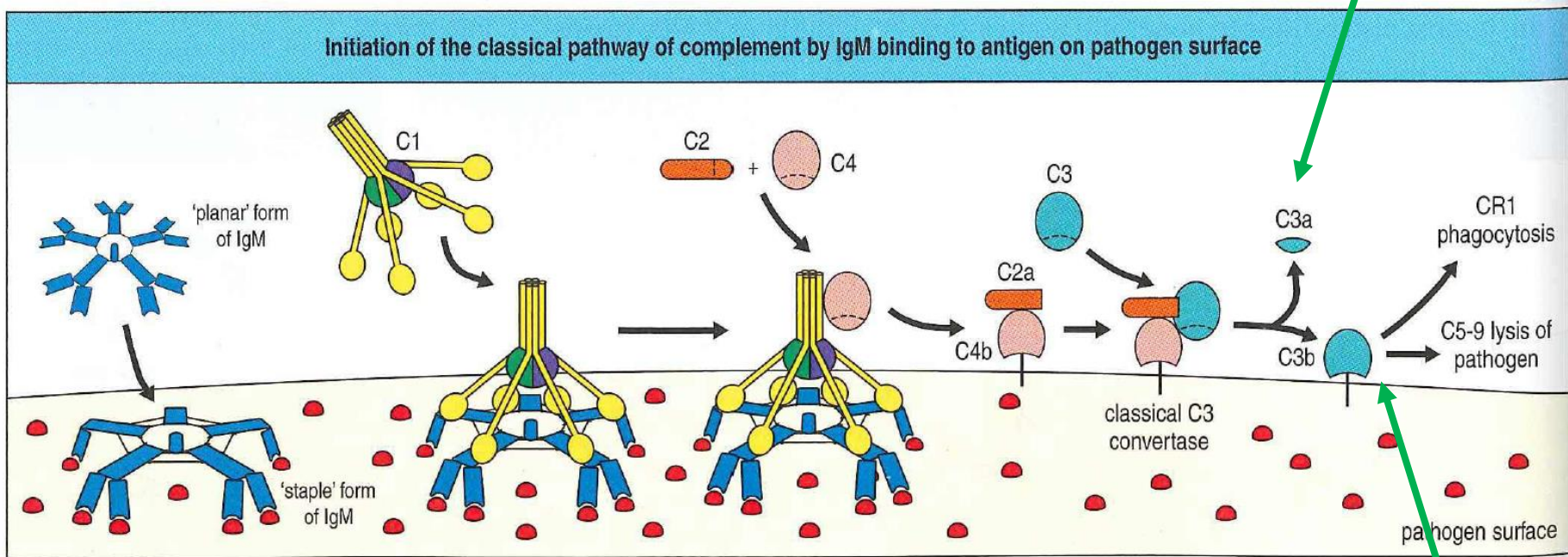
Complement tests are not very specific

Often a combination of results and the clinical picture are required for diagnosis

Many complement proteins are also acute phase proteins

Classical pathway

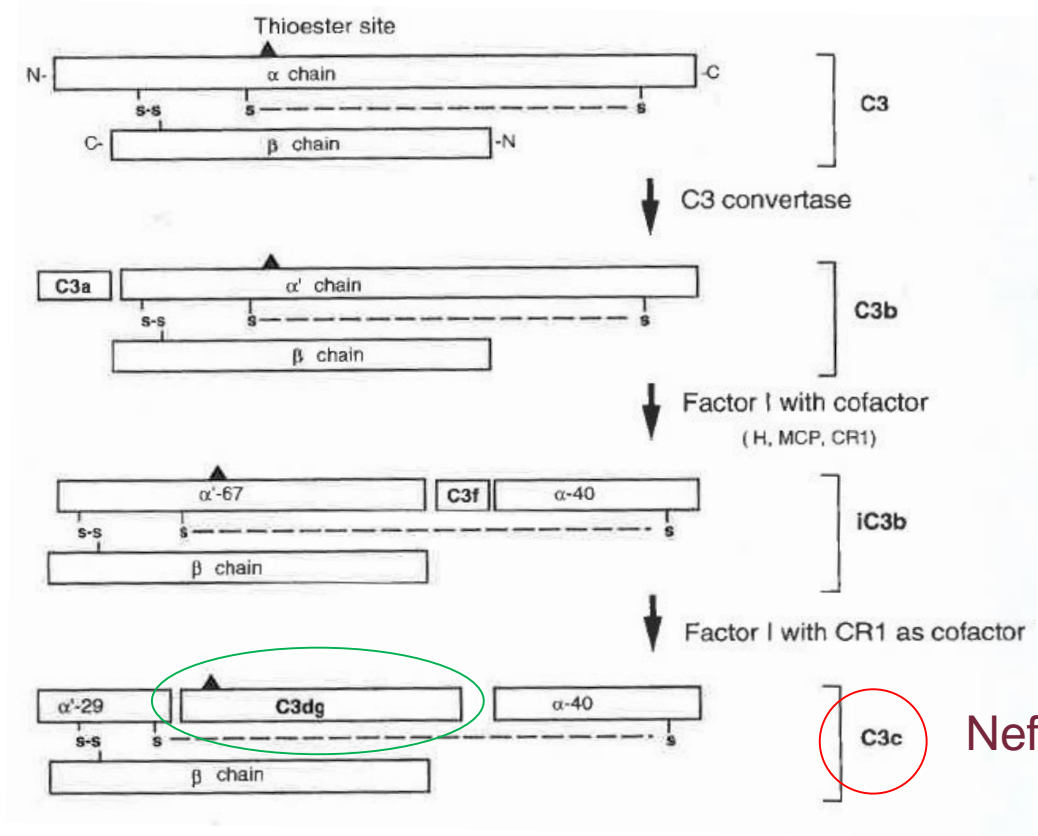
Aantonen complement verbruik





Complement verbruik

- C3d (plasma, precipitation-step)
- sC5b-9 (plasma)
- C3a, C5a (korte halftwaarde tijd)
- E-C3d / E-C4d (flowcytometry)



Nefelometer/turbidimeter



Complement verbruik

- C3d (plasma, precipitation-step)
- sC5b-9 (plasma)
- C3a, C5a (korte halfwaarde tijd)
- E-C3d / E-C4d (flowcytometry)

		target (cut-off <3,5%)	C3c (0.900-1.80 g/L)	
ctr	C3d	1.68%	0.995	(indiv plasma)
std	C3d	100%	1.44	(indiv plasma)
		Target (cut-off 2,5 AE/ml)		
ctr	sC5b-9	286	1.15	(pool)
std	sC5b-9	1000	1.12	(pool)

Verbruik vs deficiëntie

CH50

- Potentie van activatie van de klassieke route
- In serum (EDTA plasma lastig; complement activatie is Ca^{2+} en Mg^{2+} afhankelijk)
- Direct na stollen, afdraaien en serum invriezen (C-act gaat door bij KT en 4oC)

	CP (%)	AP (%)	C3 (g/L)	C4 (g/L)	C3d,g (mg/L)
SLE	15	45	0.53	0.07	7.0
C2 def	5	97	0.80	0.14	3.5
Reference interval	80–120	50–150	0.67–1.29	0.13–0.32	<5.3

○ verbruik ○ deficiency

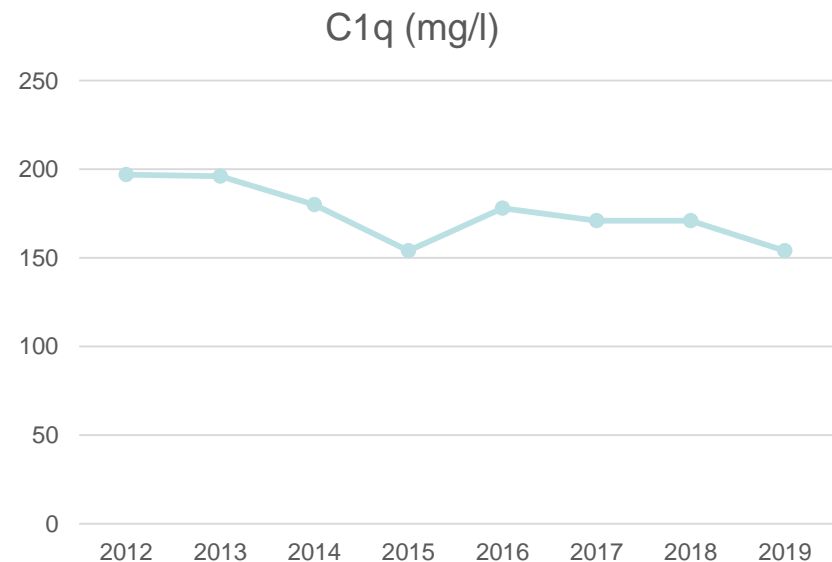


De complement rondzending

Doorloper (monster F)

Bepaling	Gem 2012.1 A	Gem 2013.1 F	Gem 2014.A	Gem 2015.A	Gem 2016.A	Gem 2017.D	Gem 2018.A	Gem 2019.F
CP (%)	50	48	52	63	56	48	47	47.6
AP (%)	3.7 (Eurod), 32 (anders)	3.8 (Eurod), 51 (anders)	1.3 (Eurod) 48 (anders)	6.5 (Eurod) 58 (anders)	4.5 (Eurod) 39 (anders)	4.7 (Eurod) 38 (anders)	8.3 (Eurod) 50 (anders)	8.5 (eurod) 58 (anders)
MBL-P (%)	25	22	21	29	21	24	24	17.8
C1q (mg/l)	197	196	180	154	178	171	171	154
C3 (g/l)	1,361	1,304	1,352	1,193	1,320	1,336	1,472	1,419
C4 (mg/l)	261	261	264	243	243	271	288	274
MBL (mg/l)	1.2	1.95	1.13	1.1	1.1	1.25	1.1	1.2

Poolserum dat een tijd bij KT heeft
gestaan →
er heeft complement activatie
plaatsgevonden



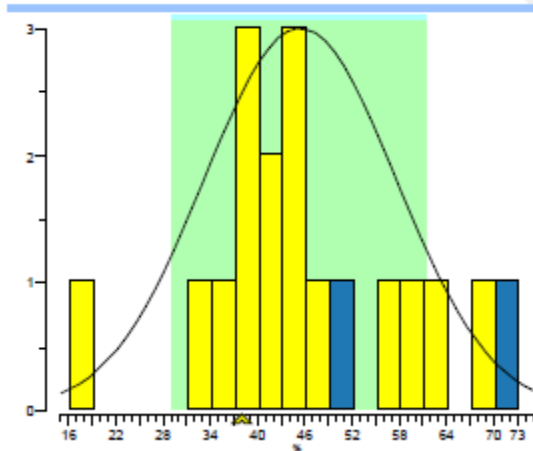


Sanquin

AP ELISA: wijst op deficiëntie (<10%)

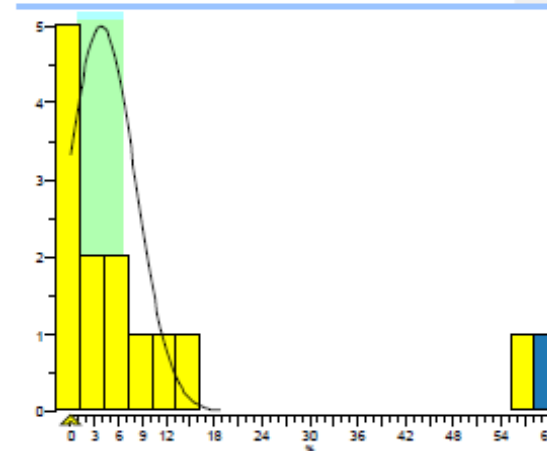
CP

2019.1 F



AP

2019.1 F



Maar dat is het dus niet!

MBL & MBL-P

Hoi Kyra,

Ik zit net de resultaten van de complementrondzending te bekijken; volgens mij is er bij 2019.1F met de MBL-P een foutje ingeslopen, klopt dat? Meeste labs meten een lage MBL-P, in het rapport staat echter bij doelwaarde 92%?

De lectine route

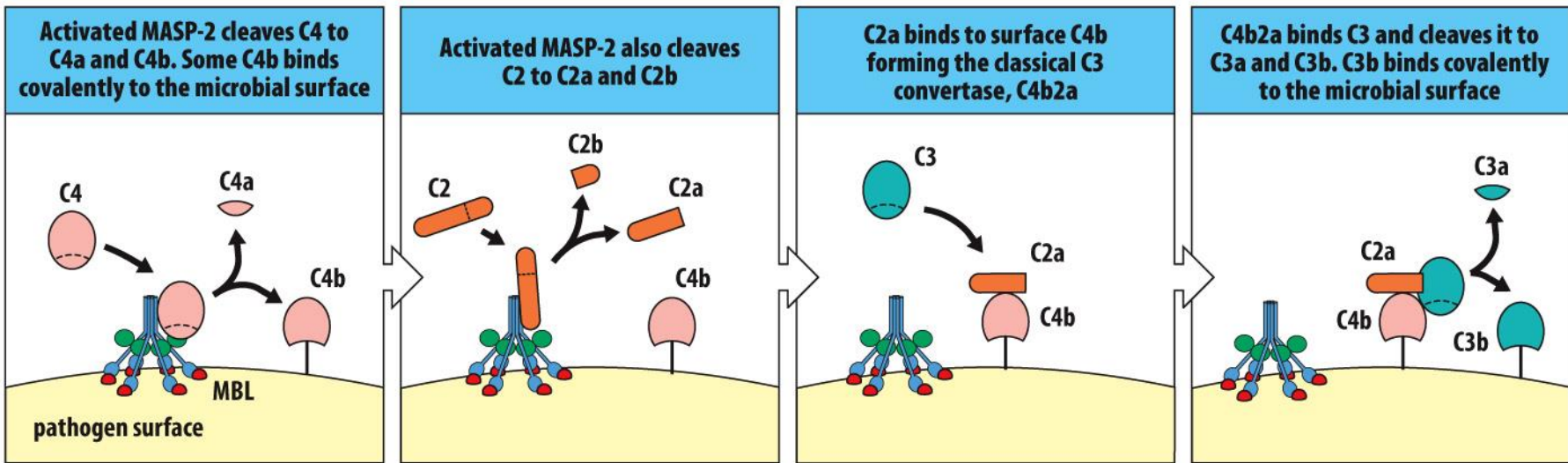
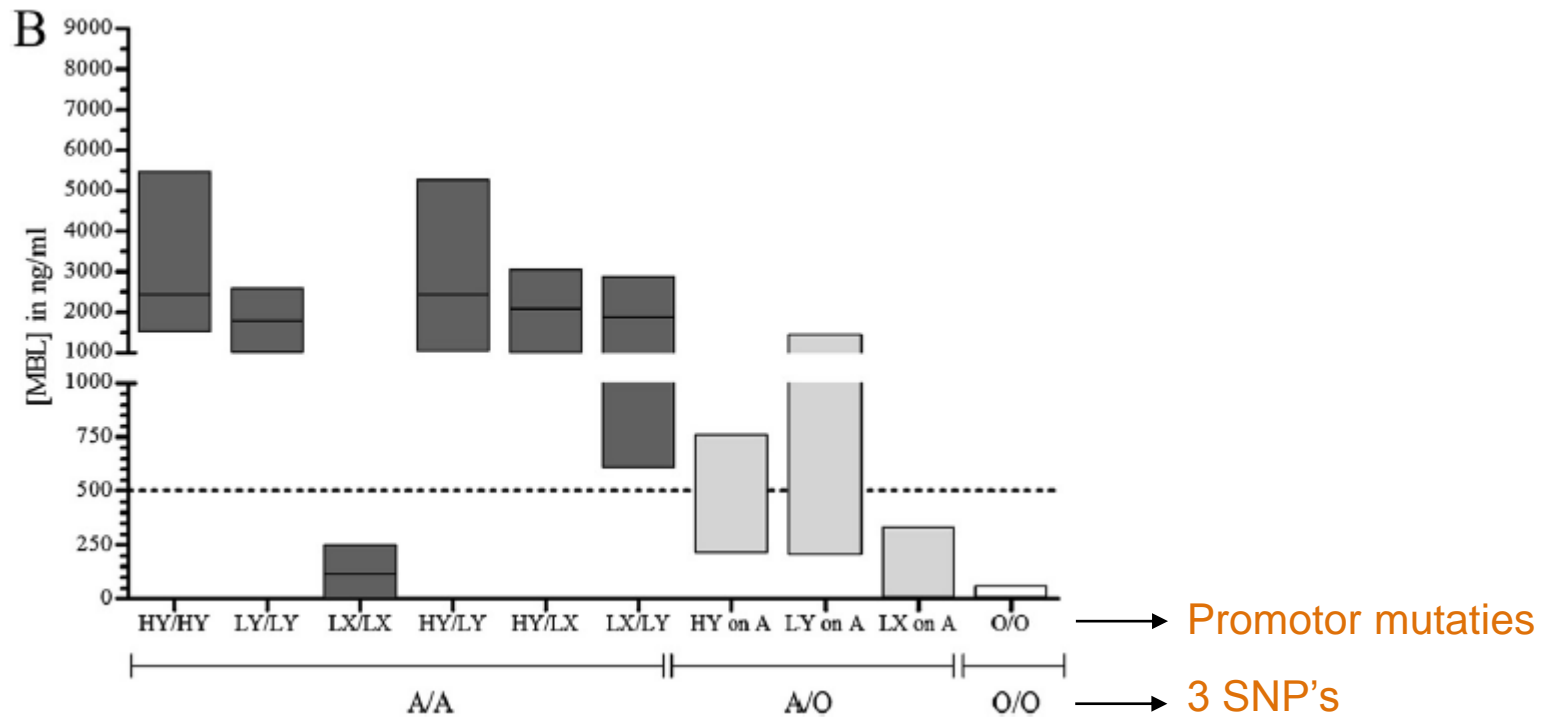


Figure 3.25 The Immune System, 4th ed. (© Garland Science 2015)

MBL deficiëntie



Keizer et al

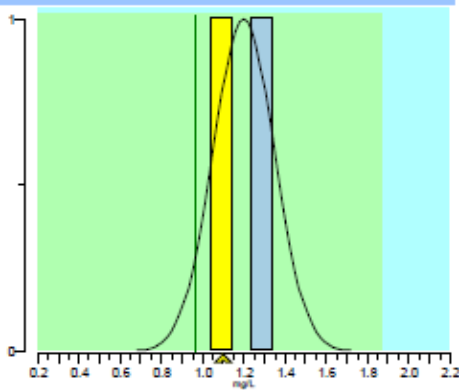
- MBL-deficiency: 10-22% (afh van definitie)
- Mostly: serum levels below 500 ng/ml, the minimal level required for opsono-phagocytosis (Neth et al., 2002).
- Heel constant >1 jaar
- Acute fase eiwit maar slechts max 3x verhoogd



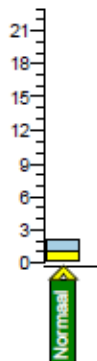
Sanquin MBL monster F

MBL

2019.1 F

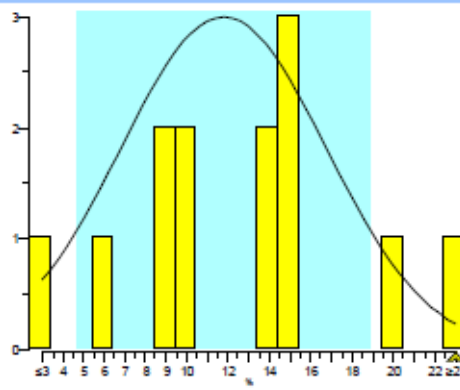


	cons.	meth.	ALTM	lab
gem.	1.20	1.10	1.20	1.1
SD				
n	2	1	2	
nu	0	0	0	
rec.	92%	100%	113%	

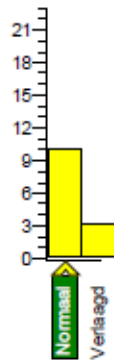


MBL-P

2019.1 F



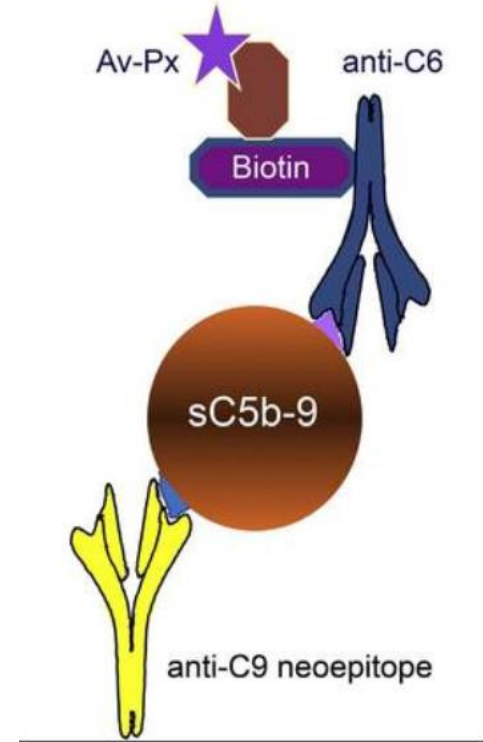
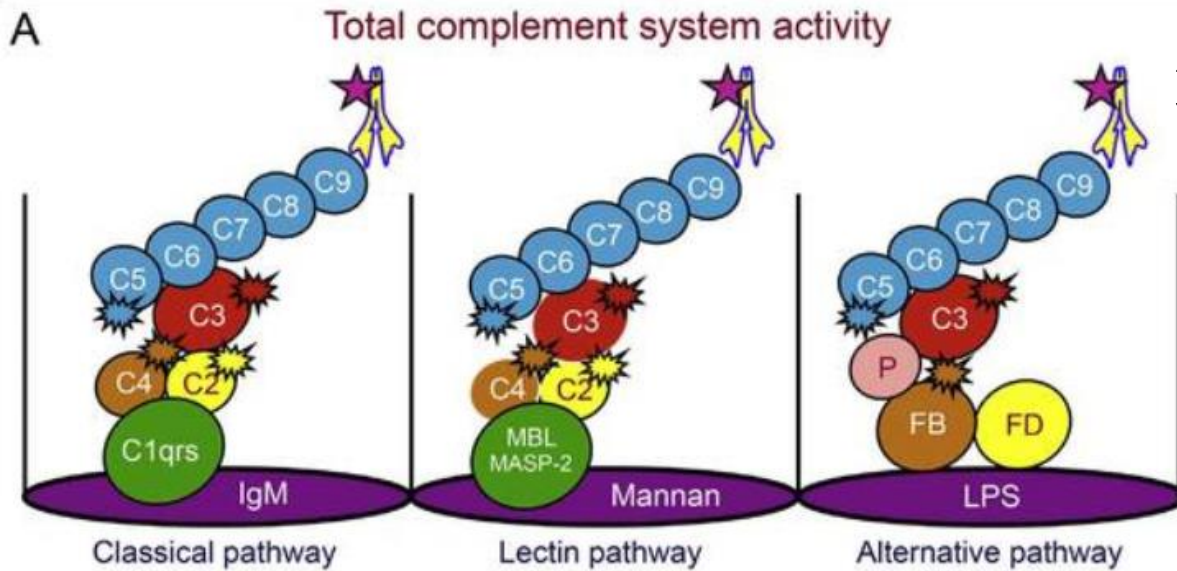
	cons.	meth.	ALTM	lab
gem.	11.8	11.8	11.8	93
SD	5.0	5.0	5.0	
n	13	13	13	
nu	1	1	1	
rec.	790%	790%	101%	



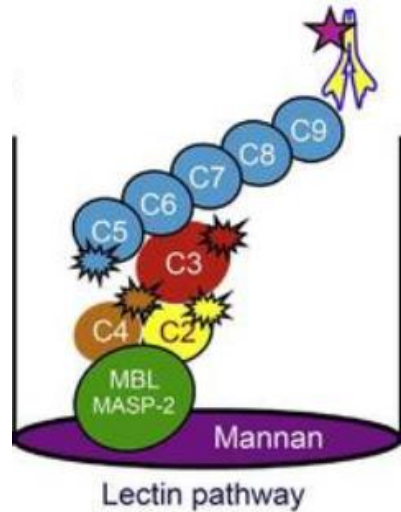
- Serumpool
- Niet direct ingevroren
- C-verbruik
(vnl C2 en FB zijn warmte-label)
- Uitleesniveau is bepalend

C4 depositie test vs C5b-9 detectie

ELISA for soluble TCC (sC5b-9)

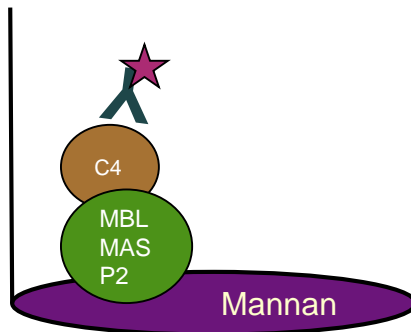


C4 depositie test vs C5b-9 detectie



MBL2 bevat veel puntmutaties
→ 7 common haplotypes

Verschillende genotypes correleren met expressie/concentratie en dus lectine route activiteit (MBL-P)



Wat wil je meten met MBL-P?



Stichting Kwaliteitsbewaking
Medische Laboratoriumdiagnostiek



- 6 -

Complement factoren 2019.1

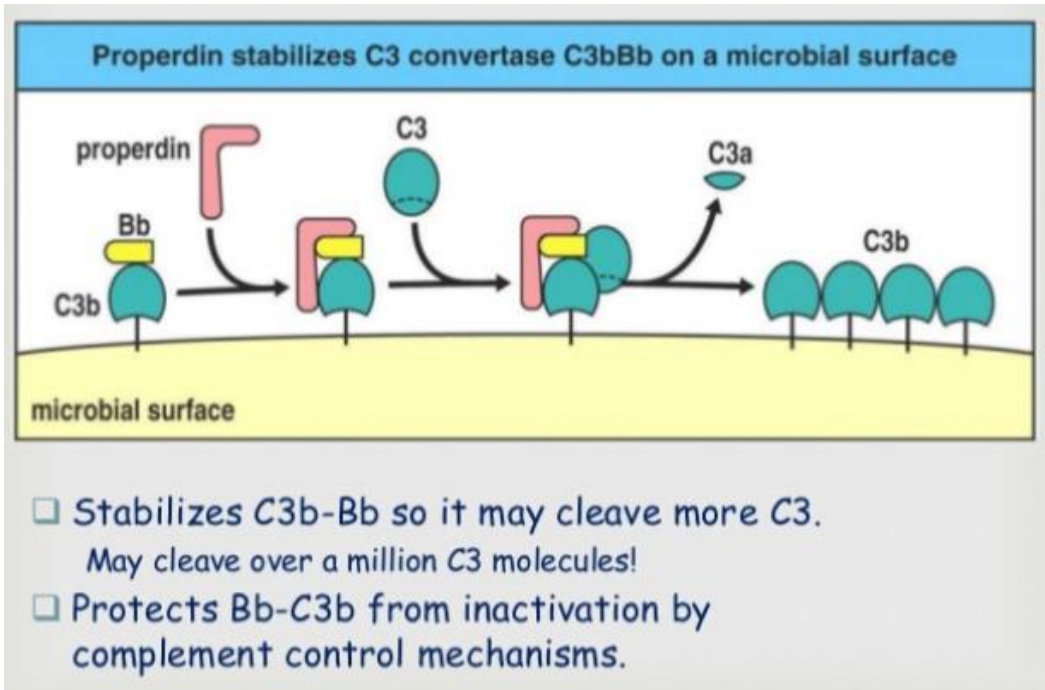
Monster :	D
Patiënt :	Jongen, recidiverende infecties.
Vraag :	Properdine deficiëntie?
Opmerkingen :	Niet duidelijk of het serum of plasma is.

1x antwoord:
Geen aanwijzing
voor P-def

- Positieve regulator (stabiliseert C3-convertase AP)
- Rec infecties (vaak meningitis) op jonge leeftijd
- Jongetjes (X-linked)
- AP50 vaak slechts licht verlaagd
AP-ELISA's vaak wel sterk verlaagd

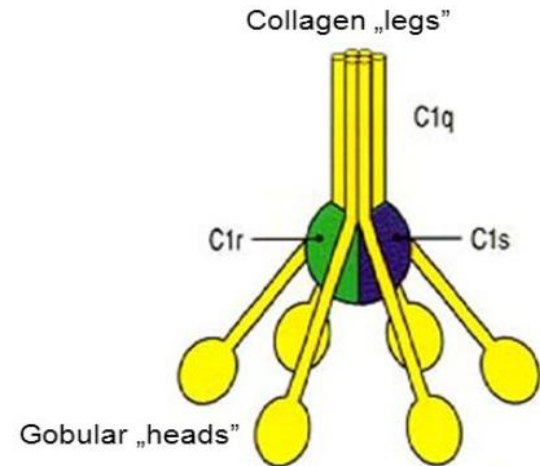
→ plasma: verwachting: AP verlaagd omdat het plasma is

Properdine

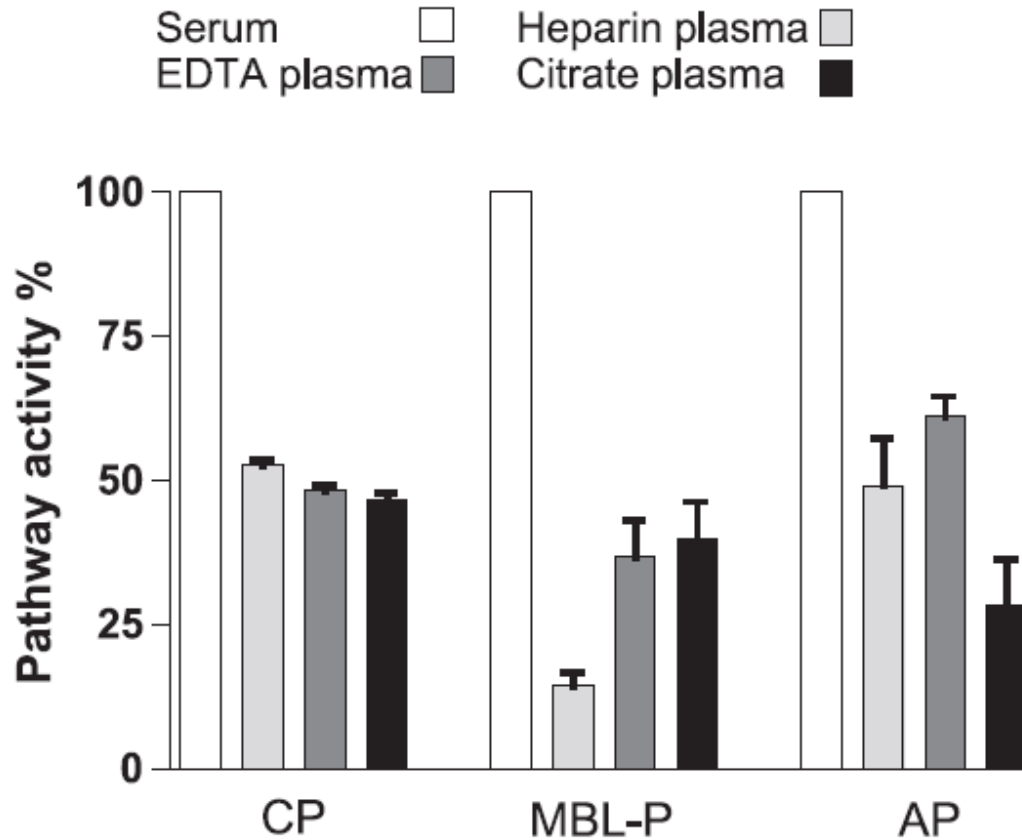


X-linked: alleen jongetjes worden ziek

- EDTA vangt tweewaardige ionen
- Klassieke route is Ca^{2+} -afhankelijk (activatie van C1s door C1r)
- Verdunning van plasma en buffer-condities bepalen dus de Ca^{2+} concentratie.
- Alternatieve route is Mg-afhankelijk (FB binding)
- Met EGTA kun je meer specifiek de CP blokkeren (hogere aff voor Ca^{2+} dan voor Mg^{2+})

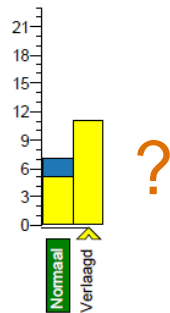
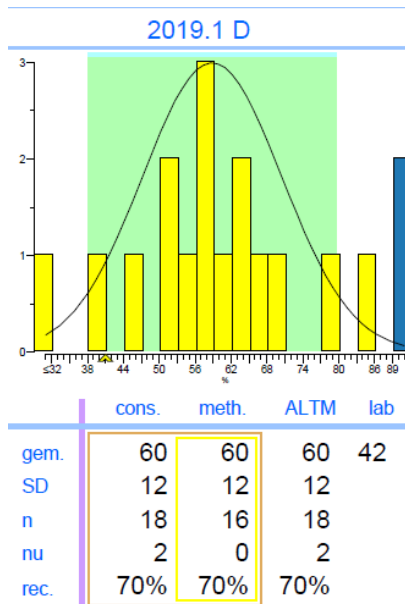


Eurodiagnostica assays

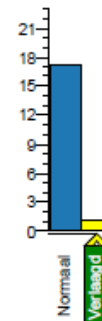
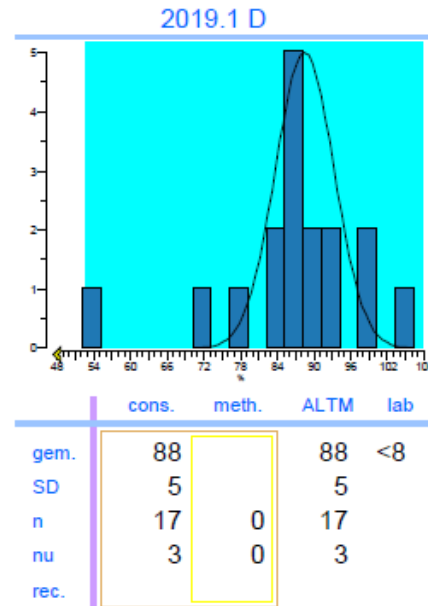


EDTA-plasma vs serum

CP



AP





Questions?

K.Gelderman@sanquin.nl