

CAT Critically Appraised Topic

Complement diagnostiek: pre-analytische fase, diagnostische workflow en interpretatie

Author: Tomas Gajdos
Supervisor: Sofie Schouwers
Search/methodology verified by: Sofie Schouwers
Date: 04/06/2024

CLINICAL BOTTOM LINE

Complement diagnostiek kent verschillende struikelblokken waaronder foutieve staalafname en -verwerking. Deze pre-analytische elementen kunnen een significante impact hebben op het testresultaat en zo leiden tot een foutieve interpretatie. Ondanks de gekende instabiliteit van sommige complementcomponenten, zijn er nog steeds relatief weinig studies terug te vinden die zich verdiepen in de verschillende stappen van de pre-analytische fase. Verder is het belangrijk dat de juiste indicaties gebruikt worden bij het aanvragen van kwantitatieve en/of functionele analyses van het complementsysteem, gezien niet alle diagnostische vraagstellingen dezelfde workflow volgen. Bij de interpretatie van afwijkende testresultaten moet men er zich altijd van bewust zijn dat onjuiste pre-analytische procedures ook een verklaring kunnen zijn, zeker bij meerdere afwijkende resultaten. In zo'n geval is een nieuwe staalafname onontbeerlijk.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Het complementsysteem is een onderdeel van het aangeboren immuunsysteem en maakt zo deel uit van de eerstelijns verdedigingsmechanismen tegen pathogenen. De activatie van dit systeem kan via verschillende manieren plaatsvinden waaronder blootstelling aan micro-organismen, apoptotische en necrotische cellen en immuuncomplexen. Het complementsysteem bestaat uit meer dan 30 verschillende eiwitten die elkaar kunnen activeren via een enzymatische cascade en kan ingedeeld worden in drie routes (zie figuur 1): de klassieke route, de lectine route en de alternatieve route (1–5). Bij de klassieke route zullen antigen gebonden antilichamen van het type IgG of IgM via hun Fc-gedeelte aan C1q binden dat deel uitmaakt van het C1 complex (= C1q, C1r en C1s). Hierdoor zullen C2 en C4 gehydrolyseerd worden met onder andere de vorming van het C3 convertase eiwit (= C4b2a complex). Vervolgens zal het C3 convertase verschillende C3 moleculen hydrolyseren met de vorming van C5 convertase (= C4b2a3b). Bij de hydrolyse van C3 en C5 worden anafylatoxines (C3a, C5a) gevormd die inflammatie zullen mediëren, maar ook C3b dat instaat voor opsonisatie en chemotaxis van neutrofielen. De C5 convertase initieert de terminale route via hydrolyse van C5 waarbij C5b het membraan aanvallend complex (MAC) zal vormen samen met C6, C7, C8 en C9. Dit complex veroorzaakt kleine poriën in het membraan van de pathogeen wat zal leiden tot lysis. De lectine route wordt geactiveerd via binding van lectines aan specifieke receptoreiwitten op pathogenen. Het voornaamste voorbeeld hiervan is het mannose bindend lectine (MBL) dat mannose zal binden dat aanwezig is op de oppervlakte van verschillende pathogenen (*Neisseria spp.*, *Salmonella spp.*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, ...). Aan dit MBL-eiwit zit een MBL-geassocieerd serine protease (MASP) dat geactiveerd zal worden na de binding van MBL aan mannose. Dit protease zal vervolgens C2 en C4 hydrolyseren met de vorming van C3 convertase en dan hetzelfde verloop kennen als de klassieke route. Bij de alternatieve route wordt het C3 convertase gevormd zonder tussenkomst van immuuncomplexen of lectines. Bij deze route is er spontane hydrolyse van C3 die in aanwezigheid van Mg^{2+} factor B zal binden. Factor B zal dan via factor D (een serine protease) gesplitst worden en, samen met de gehydrolyseerde C3, het C3 convertase (C3(H₂O)Bb) vormen wat op zijn beurt ook C3 kan hydrolyseren in C3a en C3b. In aanwezigheid van een pathogeen zal C3b op het oppervlak binden en een C3 convertase (C3bBb) vormen dat gestabiliseerd wordt via properdine (factor P). Vanaf dan zal ook via deze pathway dezelfde weg gevolgd worden om te resulteren in de vorming van MAC.

Het complementsysteem speelt zo een belangrijke rol in de verdediging tegen pathogenen via inflammatie (C3a, C5a), opsonisatie (C3b), fagocytose (C3b) en cellysis (MAC) (1–8).

Het inadequaat functioneren van het complementsysteem kan verschillende zaken ten grondslag hebben: een onevenwicht binnen de complementcomponenten (verlaagd of verhoogd) en congenitale defecten. Een verlaagde concentratie wordt voornamelijk veroorzaakt door een gestegen verbruik (via immuuncomplexen zoals bij systemische lupus erythematosus (SLE) of reumatoïde artritis (RA)), verlaagde synthese (leverpathologie) of verlies (ernstige brandwonden). Er zijn ook genetische complementdeficiënties beschreven in de literatuur (9–13). Deze

complementdeficiënties maken voor 5% deel uit van alle primaire immuundeficiënties (PID) met 0,03% prevalentie in de algemene bevolking. Deze deficiënties kunnen zich klinisch op verschillende manieren manifesteren: verhoogde gevoeligheid voor infecties, auto-immuun pathologieën (bv. SLE), nieraandoeningen (bv. atypisch hemolytisch uremisch syndroom (aHUS)) en angio-oedeem (12).

Het analyseren van complementcomponenten (kwantitatief alsook functioneel) speelt een belangrijke rol bij de diagnostiek en therapieopvolging van een tal van aandoeningen (zie tabel 1). Hierbij is van cruciaal belang dat een correcte staalafname en bewaarconditie gehanteerd worden. Verder is het belangrijk dat de juiste indicaties gebruikt worden bij het aanvragen van kwantitatieve en/of functionele analyses van het complementsysteem, gezien niet alle diagnostische vraagstellingen dezelfde workflow volgen. Op deze manier worden geen onnodige analyses uitgevoerd. Bij de interpretatie van afwijkende testresultaten moet men er zich dus steeds van bewust zijn dat pre-analytische fouten hier ook een verklaring voor kan zijn (zeker indien meerdere resultaten afwijkend zijn) en een nieuwe staalafname hierbij onontbeerlijk is. In deze CAT zal hierop dieper ingegaan worden.

QUESTION(S)

- 1) *Welke analytische methodes kunnen er gebruikt worden binnen de routine diagnostiek van het complementsysteem?*
- 2) *Wat zijn de pre-analytische condities die gehanteerd moeten worden bij routine complementdiagnostiek?*
- 3) *Welke diagnostische workflow kan er gevolgd worden bij vermoeden van deficiënties binnen het complementsysteem?*

SEARCH TERMS

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: “complement”, “laboratory”, “diagnosis”, “complement C3d”, “complement C3”, “complement C3d”, “complement sC5-9”, “ELISA”, “immunoassay”, “guidelines”, “stability”*
- 2) *UpToDate Online: “Complement diagnostics”*

APPRAISAL**1) WELKE ANALYTISCHE METHODES KUNNEN ER GEBRUIKT WORDEN BINNEN DE ROUTINE DIAGNOSTIEK VAN HET COMPLEMENTSISTEEM?***1.1 Functionele assays*

De functie van de drie complementroutes is afhankelijk van de aanwezigheid en werking van de individuele complementeiwitten. Een tekort, afwezigheid of inactivatie van één van deze eiwitten zal tot gevolg hebben dat de activiteit van de hele route beïnvloed wordt. Het belangrijkste voordeel van functionele assays is dat de volledige complementroute van initiatie tot cellysis kan gemonitord worden via één test en mogelijke deficiënties van individuele complementeiwitten worden gedetecteerd (1).

In de praktijk kunnen er drie types van functionele assays gebruikt worden: hemolytische assays, functionele ELISA testen en liposoom assays. Binnen de hemolytische assays kan de functie van de klassieke (CP) en alternatieve route (AP) bepaald worden via "CH50" en "AH50" (zie figuur 2). Bij CH50 bepaalt men via seriële dilutie van patiëntenserum de titer om in vitro 50% van schapenerythrocyten te lyseren na incubatie via de vorming van MAC. Deze erythrocyten zijn beladen met anti-schaap antistoffen (meestal konijn IgG) waarbij, éénmaal in contact met het serumstaal van de patiënt, de CP geïnitieerd wordt via C1q. Bij AH50 maakt men gebruik van hetzelfde principe, buiten het feit dat er in vitro konijnercythrocyten (kunnen geen humaan factor-H gebruiken die normaal de vorming van C3bBb C3-convertase blokkeert) en een Mg^{2+} buffer (Ca^{2+} is nodig om de CP en LP te kunnen activeren) gebruikt worden (1,3,4,14,15). Beide testen kunnen belangrijke informatie geven omtrent welke individuele complementeiwitten er mogelijks deficiënt zijn (zie vraag 3: diagnostische workflow). In steeds meer laboratoria worden deze hemolytische assays vervangen door ELISA testen. Bij deze functionele ELISA testen (zie figuur 3) worden platen gebruikt die gecoat zijn met IgM, mannose of lipopolysaccharides om zo respectievelijk de CP, LP of AP activatie te testen. Kwantificatie van de functie gebeurt meestal op basis van een alkalische fosfatase conjugaat antistof gericht tegen een neo-epitop in MAC. Het voordeel van deze assays is dat ze meer accuraat zijn en reproduceerbaar, maar met het nadeel dat er een hoge verdunning van het staal nodig is om kruisactiviteit van andere routes te voorkomen en zo mogelijks vals negatieve resultaten kan bekomen (3,4). Tenslotte kan er ook gebruik gemaakt worden van een liposoom immunoassay om de functie van de CP te bepalen (zie figuur 4). Hierbij wordt gebruik gemaakt van glucose-6-fosfaat (G6P) bevattende liposomen die gecoat zijn met dinitrofenyl (DNP) antigenen waaraan het serum van de patiënt toegevoegd wordt. Vervolgens zal er in een tweede stap anti-DNP en nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) toegevoegd worden waarbij deze antistoffen gaan binden op het liposoomoppervlak en activatie van CP teweegbrengen waarbij MAC ervoor zorgt dat G6P vrijkomt en NAD^+ reduceert tot NADH. De absorbantie hiervan zal fotometrisch gemeten worden en is evenredig met de activiteit van de CP (3,4).

1.2 Kwantificatie van afzonderlijke complementeiwitten

Er zijn verschillende types van assays (radiale immunodiffusie, elektroimmunoassay, nefelometrie, turbidimetrie en ELISA) om de concentratie van complementcomponenten te bepalen (1-4,14,15). De meest gebruikte hierbij zijn nefelometrie en turbidimetrie. Hierbij maakt men gebruik van polyklonale antilichamen gericht tegen de te kwantificeren component en zal er bij nefelometrie kwantificatie gebeuren o.b.v. lichtverstrooiing en bij turbidimetrie via troebelheid. Het gebruik van polyklonale antilichamen maakt deze assays minder gevoelig voor in vitro complementactivatie (14). Dit kan verklaard worden door het feit dat deze polyklonale antilichamen niet alleen de te kwantificeren component meten (bv. C3), maar ook de geactiveerde fragmenten ervan (bv. C3a, C3b, iC3b, C3c en/of C3d). Via deze manier kan er informatie bekomen worden over de concentratie, maar niet over de activatiestatus in vivo. Hiervoor moeten specifiek de activatieproducten bepaald worden (bv. C3d) (4).

1.3 Kwantificatie van activatieproducten

Verscheidene complementproteïnen ondergaan activatie en deactivatie door opeenvolgende proteolytische splitsingen die gepaard gaan met conformationele veranderingen. Deze activatie kan geobjectiveerd worden door de dosage van complementactiveringsproducten. De meeste laboratoria gebruiken hiervoor de dosage van C3d en/of sC5-9. C3d kan gedetecteerd worden door nefelometrie/turbidimetrie of enzymimmunoassays (EIA) met behulp van polyklonale antilichamen. Omdat deze antilichamen ook C3 en enkele andere afgesplitste componenten (C3b en iC3b) herkennen naast C3d, is het belangrijk om deze van elkaar te scheiden vóór de analyse. Dit kan bekomen worden via precipitatie met polyethyleenglycol (PEG) waarna er in het supernatans het C3d gekwantificeerd wordt (1). Van alle afbraakproducten van C3 wordt C3d het traagst gemetaboliseerd

($T_{1/2} = 4$ uur) en kan het dus op die manier veel langer gedetecteerd worden t.o.v. bv. C3a ($T_{1/2} = 2$ min.) (16–20).

Het is verder belangrijk om de concentratie van een activatieproduct steeds relatief t.o.v. het moederproduct te bekijken, vermits lage concentraties van het moederproduct in lage concentraties van het activatieproduct resulteren en er bovendien in vivo ook standaard lage fysiologische omzetting plaatsvindt van C3. Deze ratio is een meer gevoelige indicator van in vivo activatie dan de concentratie van het activatieproduct alleen (14,21). De sC5b-9 is een indicator voor volledige complementactivatie en kan gekwantificeerd worden via EIA of ELISA met monoklonale antilichamen die gericht zijn tegen een specifiek neo-epitoom in C9. Dit antilichaam is dus gericht tegen een antigeen dat normaal gezien verborgen ligt, maar na activatie zichtbaar komt te liggen (1,3,4,14).

Diverse assays om complementcomponenten en -functie te meten, zijn zowel commercieel verkrijgbaar als *inhouse* ontwikkeld (zie tabel 2 de voor- en nadelen van de courant gebruikte complement assays). Het gebrek aan standaardisatie bij sommige van deze assays vormt echter een uitdaging voor het vergelijken van resultaten tussen verschillende laboratoria. Om dit probleem aan te pakken, hebben de *International Complement Society* (ICS) en de *International Union of Immunological Societies* (IUIS) het International Complement Standardization Committee (ICSC) opgericht. Dit comité heeft eerder een niet geactiveerde standaard ontwikkeld ("*Standard 1*" (ICS#1)) voor kwantitatieve en functionele complementassays. Daarnaast is er ook een geactiveerde standaard ontwikkeld, genaamd ("*Standard 2*" (ICS#2)), voor het kwantificeren van complementactiveringsproducten (22). De meeste routine assays voor het meten van C3 en C4 maken gebruik van een andere interne standaard. In 1993 heeft het *Bureau Communautaire de Référence* (BCR) in samenwerking met the *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) referentiematerialen samengesteld voor 12 serumeiwitten waaronder C3 en C4 onder de naam "ERM-DA470" (23,24). Fabrikanten gebruiken dit referentiemateriaal in hun kalibratoren en controlematerialen. Sinds het gebruik van deze standaard is de variantie in resultaten tussen laboratoria wezenlijk gedaald (25). Uit het *Specific Proteins RIQAS EKE*-programma blijkt dat ongeveer 2/3 van de deelnemende laboratoria gebruik maken van IFCC gestandaardiseerde kalibratoren.

Verdere complementdiagnostiek zoals het detecteren van auto-antistoffen (anti-C1q bij hypocomplementische urticariële vasculitis, anti-factor H bij atypisch hemolytisch uremisch syndroom, anti-C1 inhibitor bij verworven angio-oedeem, ...), genetische testen (primaire immuundeficiënties) en flowcytometrische analyse (CD55 en CD59 bij paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie) worden buiten beschouwing gelaten binnen deze CAT.

2) WAT ZIJN DE PRE-ANALYTISCHE CONDITIES DIE GEHANTEERD MOETEN WORDEN BIJ ROUTINE COMPLEMENTDIAGNOSTIEK?

1.1 Functionele assays

Bij functionele assays gaat de voorkeur naar het gebruik van serum. Plasma kan hiervoor niet gebruikt worden, gezien factor Xa, XIa en trombine van de stollingscascade en plasmine van de fibrinolysecascade complement eiwit C3 kunnen splitsen (26). Gezien complement activatie ook temperatuurafhankelijk is, moet het serum de hele tijd op ijs bewaard worden vanaf de bloedafname tot de verwerking van het staal, om zo ex vivo activatie te onderdrukken (11). Het staal moet dus ook logischerwijs op 4°C afgedraaid worden (2000xg, 10min) binnen het uur. Bewaren van het staal mag niet op -20 °C, maar moet op -80°C gebeuren gezien dit bij -20°C te traag bevriest en er zo toch gedeeltelijke complementactivatie kan plaatsvinden (4,11,14,27,28). Tenslotte is het belangrijk om mechanische stress (schudden en vortexen) en het aantal dooicycli zo laag mogelijk te houden, gezien dit ook complementactivatie veroorzaakt (4).

1.2 Afzonderlijke complementeiwitten

Bij het gebruik van serum voor de dosage van afzonderlijke complementeiwitten moet er in rekening gebracht worden dat bij sommige assays (bv. nefelometrie en turbidimetrie) gebruik gemaakt wordt van antilichamen die zowel moederproducten als activatieproducten meten. Dit zorgt ervoor dat de gemeten concentratie gelijkend is op deze in vivo indien het staal tijdens de pre-analytische fase niet optimaal verwerkt/bewaard werd (1).

1.3 Activatieproducten

Men moet bedacht zijn op het feit dat activatieproducten van het complementsysteem in zeer lage concentraties aanwezig zijn en in vitro snel geproduceerd kunnen worden door ex vivo geïnduceerde complementactivatie. Om deze activatie te inhiberen kan er gebruik gemaakt worden van afnamemateriaal met EDTA (10 mM). EDTA cheleert Ca^{2+} en Mg^{2+} waardoor het de werking van het C1 complex en de C3 convertases inhibeert (29–32) en zo ook de complementactivatie. Het associëren van nafamostaat mesylaet (0,2 mg/mL) aan EDTA inhibeert de complementactivatie maximaal (22,29). Dit laatste wordt echter niet in routinelaboratoria gebruikt, maar wel bijvoorbeeld in de bereiding van een interne standaard. Serumstalen kunnen niet gebruikt worden voor de kwantificatie van activatieproducten, omwille van de afwezigheid van een inhibitor (4). Citraatplasma geniet niet de voorkeur t.o.v. EDTA-plasma, gezien uit studies blijkt dat dit minder stabiel is bij het gebruik van ELISA: gecentrifugeerd citraatplasma is vier uur stabiel op kamertemperatuur (KT) en drie uur gekoeld (4°C). Gecentrifugeerd EDTA-plasma is daarentegen tot acht uur stabiel op KT en 24 uur gekoeld (4°C) (28). In de studie van *Troldborg et al. 2018* werd de stabiliteit van C3b onderzocht en bleek EDTA-plasma superieur aan serum (19). De concentratie van C3dg in serum nam toe met de tijd en temperatuur, maar niet in EDTA-plasma (zie grafiek 1. A. serum en B. EDTA)). Tenslotte was op de stabiliteit van EDTA-plasma slechts een effect te zien na de vierde dooicyclus (zie grafiek 2).

Indien de kwantificatie niet kan gebeuren binnen de aangegeven tijdspanne, moet het staal diepgevroren worden op -80 °C (2,4,14,27). In het laboratorium van LHUB-ULB wordt echter een bewaring op -20°C gehanteerd voor de dosage van bijvoorbeeld C3d. Dit laatste werd intern gevalideerd en is daarom verschillend van wat er in de literatuur vermeld staat. In de labogids van het UZA wordt bij de functionele testen expliciet vermeld dat serumstalen op -80°C moeten bewaard worden tot verzending. Verzending naar laboratoria moet op droogijs plaatsvinden (4). In alle labogidsen van Vlaamse universitaire laboratoria staat vermeld dat stalen diepgevroren verzonden moeten worden, zowel voor functionele testen als voor dosage van individuele componenten en activatieproducten (zie tabel 3). De enige uitzondering is dat stalen voor dosage van C3 en C4 naar het UZA op KT mogen verzonden worden.

Bij verschillende complementassays is de pre-analytische fase een cruciaal onderdeel om een correct testresultaat te bekomen. Verschillende aspecten vallen hier onder: afnamemateriaal (EDTA, citraat of serum), staalverwerking (tijd tussen afname en het invriezen), bewaarcondities (KT, gekoeld of ingevroren), bewaartermijn, enz. Elk van deze aspecten kan een foutief resultaat teweegbrengen met een verkeerde interpretatie als gevolg. Het is dus belangrijk dat al deze stappen correct nageleefd worden en indien niet er toch geopteerd wordt voor een nieuwe staalafname.

3) WELKE DIAGNOSTISCHE WORKFLOW KAN ER GEVOLGD WORDEN BIJ VERMOEDEN VAN DEFICIËNTIES BINNEN HET COMPLEMENTSISTEEM?

Afhankelijk van waar de deficiëntie zich bevindt binnen de verschillende complementroutes, kan de patiënt een andere presentatie vertonen. Deficiënties binnen de CP (CIq, C1r, C1s, C2 en C4) zijn voorbeschikt voor het ontwikkelen van auto-immuun pathologie (SLE, dermatomyositis, Henoch-Schönlein purpura, juveniele RA en glomerulonefritis). Binnen deze groep van patiënten is er ook een verhoogd risico op het ontwikkelen van ernstige bacteriële infecties (meningitis, pneumonie, osteomyelitis of sepsis). Deze worden voornamelijk veroorzaakt door omkapselde bacteriën (meestal *Streptococcus pneumoniae*) (3,12,27).

Patiënten met deficiënties binnen de TP (C5, C6, C7, C8 en C9) hebben een verhoogd risico op meningokokkenmeningitis. Indien er een familiale voorgeschiedenis is met deze infectie moet men hierop bedacht zijn. Bij recidiverende *Neisseria spp.* infecties moet men ook bedacht zijn op properdine deficiëntie van de AP (12). Patiënten die zich presenteren met een kliniek van aHUS (hemolytische anemie, trombocytopenie en nierfalen in afwezigheid van directe verwekkers (zoals bv. Shiga toxine producerende bacteriën) kunnen ook een defect hebben in de AP met mutaties in de regulatoreiwitten (factor H of factor I) (12). Tenslotte kunnen er ook deficiënties aanwezig zijn in de LP. Hierbij hebben patiënten een verhoogd risico op bacteriële, virale en protozoaire infecties (1,12).

Bij een klinisch vermoeden van een deficiëntie binnen het complementsysteem wordt er geopteerd om eerst te screenen via functionele assays van elk van de drie complementroutes: CP, AP, LP (1,3,11,12). Zo krijgt men een meer gerichte indicatie over welke deficiënties er aanwezig kunnen zijn. Een geïsoleerd verlaagde CH50 impliceert defecten aan het begin van de CP. Hierbij is het nuttig om CIq, C1r en C1s te kwantificeren. Indien enkel AP50 verlaagd is, is het nuttig om factor B, D, properdine, factor H en I (deze laatste twee zijn regulatoreiwitten) te doseren. Bij een gedaalde LP activiteit worden best MBL en MASP 1&2 bepaald. Verder moet er bij concomitant gedaalde activiteit van de CP en LP een dosage uitgevoerd van C2 en C4. Tenslotte kan het ook zijn dat de drie routes een verlaagde activiteit hebben. Dit impliceert een mogelijk defect aan de TP. Hierbij wordt er dus een dosage uitgevoerd van C3, C5, C6, C7, C8, C9. Men moet bedacht zijn op het feit dat de aanwezigheid van meer dan één deficiëntie zeer zeldzaam is en het eerder waarschijnlijk is dat er een pre-analytische fout plaatsgevonden heeft. De kwantificatie van de desbetreffende componenten gebeurt best nog eens opnieuw. Een uitzondering hierop is het voorkomen van meerdere deficiënties binnen de LP (MBL + MASP2 deficiëntie). Het kan ook zijn dat er aanwezigheid is van een deficiëntie in één van de regulatoreiwitten of autoantistoffen, maar dit wordt best pas uitgesloten na het herhalen van de dosage (12). Finaal kan er bij de aanwezigheid van een deficiëntie een confirmatie gebeuren via genetisch onderzoek (zie overzicht in tabel 4).

Indien de dosage van individuele complementcomponenten geen afwijkingen weerhoudt, kan de complementactivatie getest worden om zo te achterhalen of het afwijkend resultaat van de functionele assay te kaderen is in een actief verbruik of niet. Indien hier een afwijkend resultaat terug te vinden is, heeft men te maken met een pathologische complementontregeling (12).

Om te kijken of deze workflow ook gehanteerd wordt bij een vermoeden van PID, hebben we een query uitgevoerd van alle MBL aanvragen van de afgelopen 10 jaar in het GZA ziekenhuis binnen de pediatrische populatie. Hierbij werd er gekeken naar de volledigheid van de complementscreeningstesten (werden alle drie de functionele testen aangevraagd?) alsook de klinische indicaties.

In totaal werd de MBL dosage 27 keer aangevraagd. Opvallend was dat dit steeds aangevraagd werd zonder eerst de LP functie uit te voeren (zie tabel 5). Verder werd er niet altijd gescreend in de drie complementroutes: binnen de 27 aanvragen voor MBL werd er slechts bij 18 (67%) aanvragen CH50 en AP50 aangevraagd. Bij 5 (19%) van de aanvragen ontbraken zowel CH50 als AP50, bij 1 (4%) aanvraag werd alleen CH50 mee aangevraagd en bij 3 (11%) aanvragen enkel AP50. Volgens de meest recente richtlijnen van de *European Society for Immunodeficiencies* (ESID) en de *European Reference Network on Rare Primary Immunodeficiency, Autoinflammatory and Autoimmune Diseases* (ERN RITA) zouden bij aanvragen bij vermoeden van PID eerst functionele complementtesten (CH50, AH50 en LP) aangevraagd moeten worden om zo een beeld te krijgen over welke route eventueel aangetast is (12). Indien LP activiteit verlaagd is (<10%), dan kan in tweede lijn een MBL dosage uitgevoerd worden. Er werd besloten om toekomstige MBL aanvragen te vervangen door LP activiteit bepaling, gezien een normale lectine activiteit een MBL deficiëntie uitsluit (12). Daarnaast zullen een MBL/LP activiteit aanvraag, ook CH50 en AH50 aangevraagd worden.

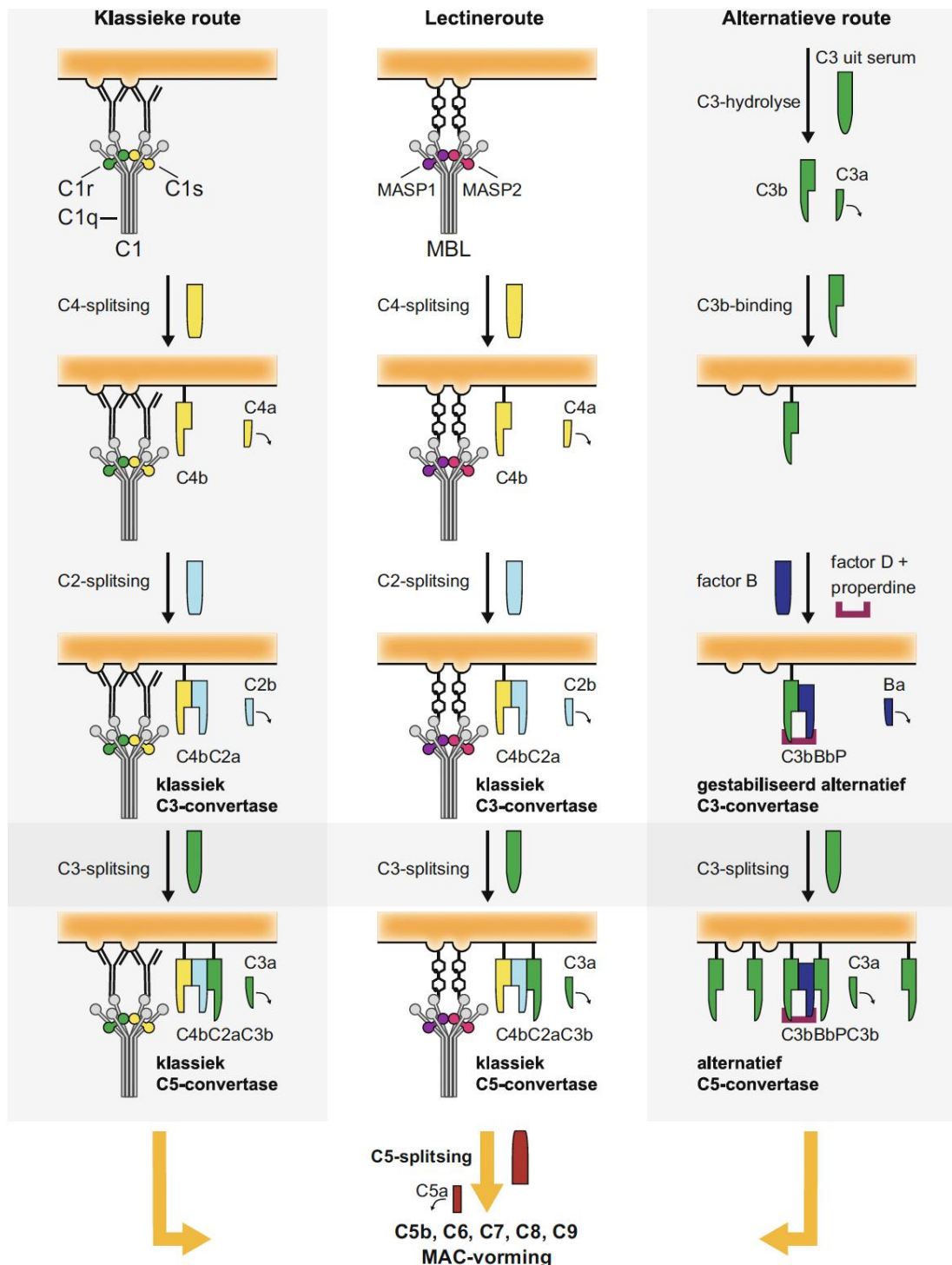
COMMENTS

To DO/ACTIONS

- 1) Strenger toezien op de pre-analytische fase: Correct aangekomen op het labo? Staal binnen de nodige tijd verwerkt? Verzending diepgevroren? Indien dit niet correct is, moet een nieuw staal afgenomen worden.
- 2) Nakijken of er correcte indicaties gehanteerd worden bij het aanvragen van vermoeden van PID a.d.h.v. de ESID/ERN RITA richtlijnen en indien nodig, de aanvragende arts informeren en de juiste analyses aanvragen.
- 3) Bij MBL aanvragen zal eerst lectine activiteit bepaald worden. Indien een normaal resultaat, dan wordt de MBL analyse gewist met de volgende commentaar: "Een normale activiteit van de lectine pathway (>10%) sluit een MBL deficiëntie uit"

ATTACHMENTS

Figuur 1: Het complementsysteem (8)

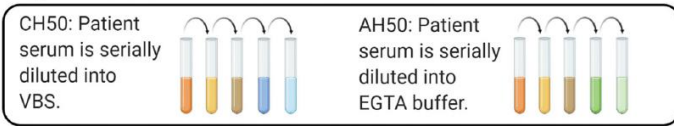


Figuur 2: CH50 en AH50 hemolyse assay (3)

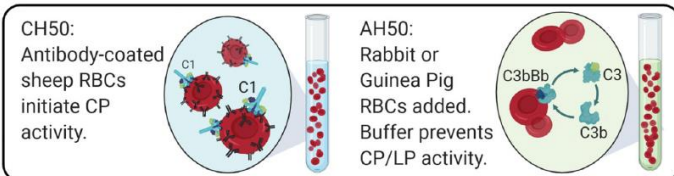
Reagents

CH50: Classical Pathway • Veronal Buffered Saline (VBS) • Sheep RBCs • Rabbit Anti-Sheep antibody	AH50: Alternative Pathway • EGTA buffer • Rabbit or Guinea Pig RBCs • CP and LP blocked by lack of Ca^{2+}
---	--

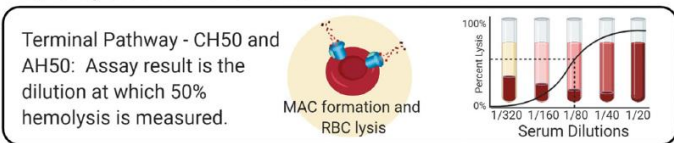
Step 1: Dilution



Step 2: Add RBCs and incubate

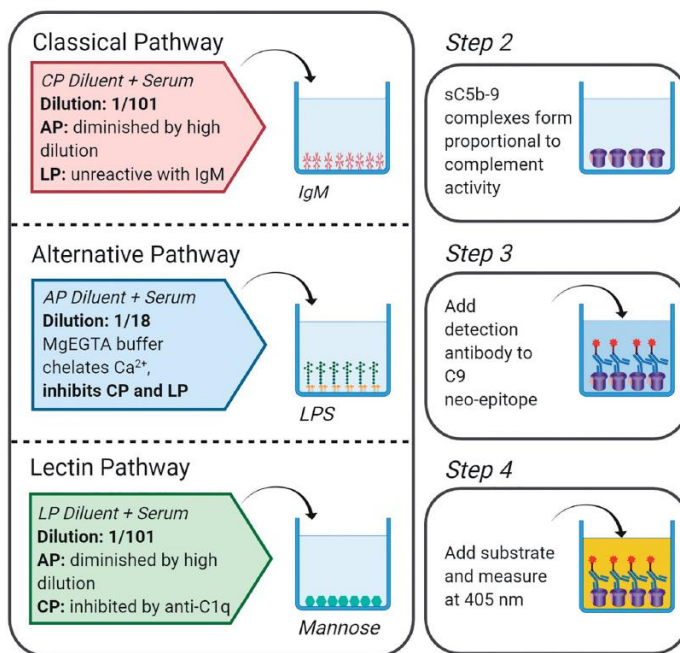


Step 3: Lysis and measurement

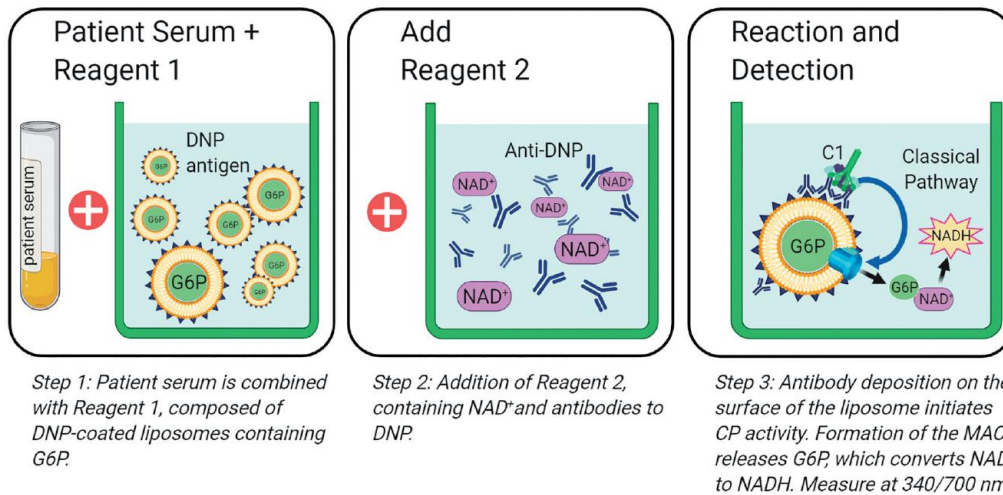


Figuur 3: ELISA functionele assay (3)

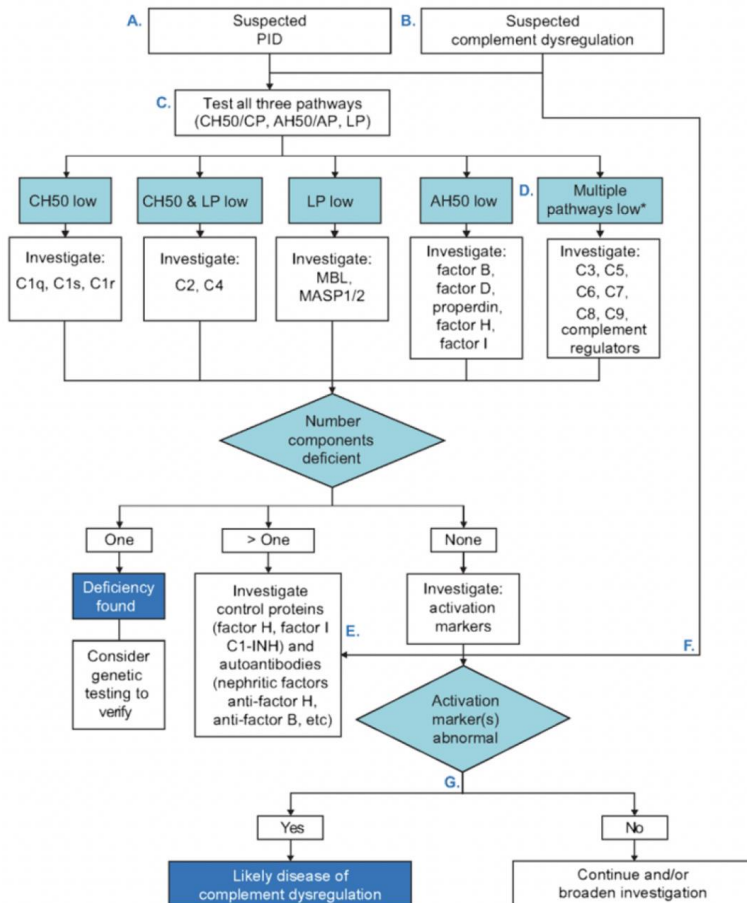
Step 1



Figuur 4: Liposoom assay (3)



Figuur 5: Workflow voor complementdiagnostiek (12)



A. Klinisch vermoeden van een primaire immuundeficiëntie

B. Klinisch vermoeden van een complementontregeling

C. Indien niet alle functionele testen uitgevoerd kunnen worden, test dan de individuele componenten van de ontbrekende route

D. Indien verschillende routes laag zijn, ligt de deficiëntie waarschijnlijk in het terminaal gedeelte

E. Doseren van geactiveerde componenten kan nuttig zijn om te bepalen of een component laag is door consumptie. Als er een echte deficiëntie is de intacte complementcomponent laag/afwezig met een normale geactiveerde complementcomponent.

F. Bij complementontregeling kan het testen van zowel functie als concentratie helpen om een volledig beeld te geven van de omvang en de betrokken route.

G. Activatiemarkers om te overwegen: sC5b-9, C4a, C4d, C3a, C3d, iC3b, C5a, Bb, Ba, en C3 convertase. Best één merker van elke route meten.

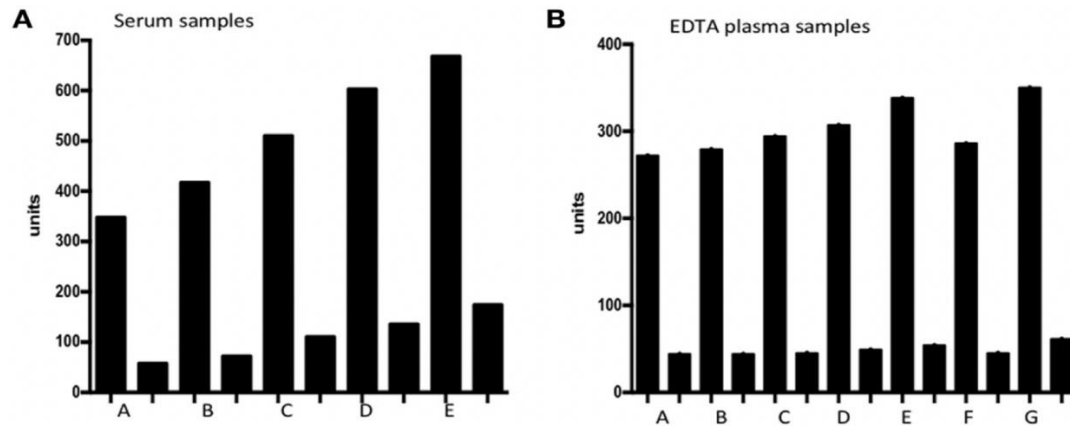
Grafiek 1: Stabiliteit van C3d in serum en EDTA (19)

(A) Geeft de stabiliteit weer in serum

(B) Geeft de stabiliteit weer in EDTA-plasma.

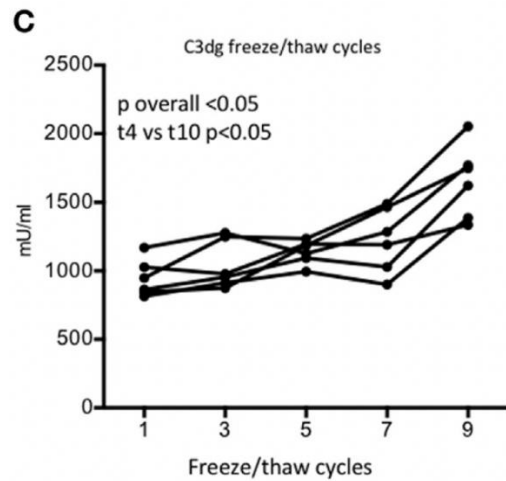
Elk staal werd in deze studie 100x verdund (lange balken) en 1000x verdund (korte balken)

In de x-as: (A) Onmiddellijk ingevroren, (B) Na 60 min. op KT ingevroren, (C) Na 60 min. op 37°C ingevroren, (D) Na vijf uur op KT ingevroren, (E) Na vijf uur op 37°C ingevroren, (F) EDTA-plasma 1 uur op KT alvorens af te draaien, (G) EDTA-plasma 5 uur op KT alvorens af te draaien.



Grafiek 2: (19)

(C) Het effect van dooicycli op EDTA-plasma bij zes stalen.



Tabel 1: Overzicht van de voornaamste indicaties om complement diagnostiek uit te voeren (15)

Indications for clinical complement analysis	
Diagnosis of inherited and acquired complement deficiency	
Symptom(s)/disease	Complement aberration(s)
Recurrent bacterial infections (especially invasive infections with <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , and meningococci)	Deficiency of factor I, CP, AP, or TP components
Meningococcal infection	Deficiency of properdin, factor B, factor D or TP components
Angioedema	Deficiency of C1INH; HAE and AAE, autoantibodies to C1INH
SLE or SLE-like disease	Deficiency of CP components/complement consumption through CP, autoantibodies to C1q
aHUS	Mutations (heterozygous or compound heterozygous), hybrid genes, etc, in genes of AP components and complement regulators; autoantibodies to factor H
C3G, PLD, MPGN 1, and 3	Autoantibodies to C3 convertase and/or C5 convertase, in some cases mutations or rare variants in genes of AP components or complement regulators
PNH	Clonal somatic mutation in the <i>PIGA</i> gene leading to loss of membrane regulators CD55 and CD59
AGN	Temporary consumption through the AP
Ecuzimab treatment	No formation of TCC or C5a
AMD	Polymorphisms and rare variants in the genes of factor H, C2, factor B, factor I and C9

AAE, acquired angioedema; AGN, acute poststreptococcal glomerulonephritis; aHUS, atypical hemolytic uremic syndrome; AMD, age-related macular degeneration; AP, alternative pathway; C1INH, C1 inhibitor; CP, classical pathway; C3G, C3 glomerulopathy; HAE, hereditary angioedema; HUVS, hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome; MPGN, membranoproliferative glomerulonephritis; PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; PLD, acquired partial lipodystrophy; SLE, systemic lupus erythematosus; TCC, terminal complement complex (sC5b-C9); TP, terminal pathway.

Tabel 2: Voor- en nadelen van courante complement assay's (15)

Complement assays		
List of main complement assays, not including genetic analysis or quantification of native complement components		
Assay	Features	Commercially available/not
Functional assays		
CH50/AP50	Hemolytic, quantitative assays. Tube titration. – Cumbersome. Blood donor animal-dependent variation. Properdin deficiency not readily detected (AP50).	No
EIA for CP/AP/MBL-LP	+ Easy to perform. Properdin deficiency will be detected. – Considerable CV.	Yes
Liposome-based CP assay	+ Easy to perform, high precision, high throughput. – Only CP.	Yes
Activation markers		
C3d, nephelometry/turbidimetry	+ High throughput. – Requires pretreatment of samples (removal of C3b and native C3).	Yes
C3d, double-decker rocket immunoassay	+ No need for pretreatment of samples. – Low throughput.	
TCC/sC5b-C9 by EIA	+ Easy to perform. – More sensitive to transport/storage than C3d.	Yes
C5a, C3a by EIA	Due to short half-life mainly suitable for research purposes. Easy to perform.	Yes

Tabel 3: Overzicht van staaltypes, -condities en methodes voor complementdiagnostiek in Vlaamse/Brusselse universitaire laboratoria

Parameter	Uitvoerend laboratorium				
	UZL	UZA	UZG	VUB	ULB
Functionele assays					
CP activiteit					
Staaltype	Serum	Serum	Serum	Serum	Serum
Verzendingsconditie	Ingevroren	Diepgevroren	Ingevroren	Ingevroren	Ingevroren
Methode	ELISA	ELISA	Liposoomb Immunoassay	Turbidimetrie	Turbidimetrie
AP activiteit					
Staaltype		Serum	Serum		Serum
Verzendingsconditie		Diepgevroren	Ingevroren		Ingevroren
Methode		ELISA	ELISA		ELISA
LP activiteit					
Staaltype		Serum	Serum		Serum
Verzendingsconditie		Diepgevroren	Ingevroren		Ingevroren
Methode		ELISA	ELISA		ELISA
Individuele componenten					
C1q					
Staaltype	Serum				EDTA
Verzendingsconditie	Ingevroren				Ingevroren
Methode	Nefelometrie				Nefelometrie
C2					
Staaltype	Serum				EDTA
Verzendingsconditie	Ingevroren				Ingevroren
Methode	Radiale immunodiffusie				Radiale immunodiffusie
C3					
Staaltype	Serum	serum	Serum/heparine	Heparine	EDTA
Verzendingsconditie	Ingevroren	kamertemperatuur	Ingevroren		Ingevroren
Methode	Nefelometrie	Turbidimetrie	Turbidimetrie	Turbidimetrie	Turbidimetrie
C4					
Staaltype	Serum	serum	Serum/heparine	Heparine	EDTA
Verzendingsconditie	Ingevroren	kamertemperatuur	Ingevroren		Ingevroren
Methode	Nefelometrie	Turbidimetrie	Turbidimetrie	Turbidimetrie	Turbidimetrie
C5					
Staaltype	Serum				EDTA
Verzendingsconditie	Ingevroren				Ingevroren
Methode	Nefelometrie				Nefelometrie
Activatiecomponenten					
C3d					
Staaltype	EDTA	EDTA			EDTA
Verzendingsconditie	Ingevroren	Ingevroren			Ingevroren
Methode	Nefelometrie	Nefelometrie			Nefelometrie

Tabel 4: Overzicht van genetische complementdeficiënties (12)

Deficiency	Gene	Inheritance	Published number of patients	Associated symptoms/disorders
C1q	1p36	AR	~70 patients	SLE, systemic infections with encapsulated organisms;
C1r/s (often combined)	12p13	AR	~10 patients	Heterozygous C2 deficiency may have a reduced CH50 but remain asymptomatic
C2	6p21	AR	1:20,000	
C4 (total C4 deficiency)	6p21	AR	~30 patients	SLE, RA, systemic infections with encapsulated organisms
C4A or C4B	MHC class III region on the short arm of chromosome 6	Complex	1:250	Susceptibility to lymphoma, sarcoidosis, SLE, coeliac disease; prolonged post-infectious symptoms; intolerance to sulphonamides and doxycycline
C3 GoF	19p13	AD	2–8% of aHUS patients	aHUS
C3	19p13	AR	~40 patients	Pyogenic infections, neisserial infections, glomerulonephritis, AMD
Factor H	1q32	AR	< 30 patients	
Factor I	4q25	AR	Rare	
C5	9q33–34	AR	Rare	Neisserial infections; recurrent meningitis
C6	5p13	AR	~1:2000 Afro-Americans. Rare in Caucasians	
C7	5p13	AR	~1:10,000 in Moroccan Jews. Rare in other populations	
C8 α - γ /C8 β	C8 α / β : 1p32 C8 γ : 9q34	AR	Rare	
C9	5p14–p12	AR	1:1000 in Japan	Neisserial infections (mostly asymptomatic)
Factor B	6p21	AR	One case	Neisserial and pneumococcal infections, aHUS
Factor D	19p13	AR	2 families	Bacterial infections
MBL	10q11	Polymorphism	5%	Data regarding clinical impact of MBL deficiency are contradictory. Possible effects include susceptibility to bacterial infections and to autoimmunity
Ficolin 3 (H-ficolin)	1p36	Polymorphism	< 10 patients	Various clinical phenotypes
MASP1	3q27	AR	Rare	3MC syndrome
MASP2	1p36		0.03%	Respiratory infections, mostly asymptomatic
C1 inhibitor	11q11–q13	AD	1:50,000	HAE with C1-INH deficiency
C4-binding protein	1q32	Unknown	One case	Atypical Morbus Behçet, angioedema, protein S deficit
Properdin	Xp11	X-linked recessive	Rare	Meningitis (<i>Neisseria</i>)
CFHR1–3 deletion	1q32	Complex	Variable (UK 3.4%)	aHUS*, SLE and protection from AMD and IgA nephropathy
Thrombomodulin (CD141)	20p11	AD	Rare	aHUS
CD46/MCP	1q32	Most often heterozygous or compound heterozygous mutations	Rare	aHUS
CD55/DAF	1q32	AR	1–2 cases per million	**PNH
CD55/DAF	1q32	AR	Rare	Protein losing enteropathy CHAPEL syndrome
CD59	11p13	AR	1–2 cases per million	**PNH
CD59	11p13	AR	<20 patients	Chronic hemolysis and relapsing peripheral demyelinating disease, cerebral infarction
CR2 (CD21)	1q32	AR	Rare	Infections, associated with CVID
CR3 (CD18/CD11b)	CD18: 21q22	AR	1:1 million	LAD
CR4 (CD18/CD11c, LFA-1)	CD11b: 16p11 CD11c: 16p11			

Tabel 5: Overzicht van MBL aanvragen van de afgelopen 10 jaar (2015-2024)

Afwijkende resultaten zijn weergegeven in het rood

NA: Niet aangevraagd

BWI: bovenste luchtweginfecties

MBL: mannose bindend lectine

CF: *cystic fibrosis*

*Hierbij werd de lectine activiteit wel eerst bepaald.

	Nummer	Leeftijd	Geslacht	Kliniek	MLB (ng/mL)	CH50 (U/mL)	AP50 (%)
2018	1.	<1	V	Pneumokokkenmeningitis	1037	51,3	65
	2.	2	M	Recidiverende otitiden	3380	50	64
2020	3.	1	M	Recidiverende otitiden	>4000	59,9	28
	4.	3	V	Recidiverende BWI, zus heeft MBL deficiëntie	163	54,3	32
	5.	3	V	Pneumokokkensepsis, recidiverende virale infecties	188	60,8	37
2021	6.	2	V	Ernstige pneumonie met abces	tws	59,6	57
	7.	1	V	Pneumonie met abcesvorming	3422	45,9	29
2022	8.	3	M	Recidiverende otitiden	>4000	42,3	NA
	9.	3	M	Otitis media, broer gekend met PID	1735	NA	NA
	10.	1	M	<i>H. influenza</i> meningitis	>4000	76,1	85
	11.	2	V	Recidiverend ziek (viraal)	tws	tws	81
	12.	1	V	Recidiverende otitiden	>4000	NA	NA
	13.	4	V	Recidiverende bronchieëctasiën, negatieve CF genetica	330	NA	93
2023	14.	1	M	Atelectase, multipole pneumonieën	tws	44,6	NA
	15.	<1	M	2x mastoïditis met een acute mastoïdectomie	reagens probleem	tws	71
	16.	<1	M	Recidiverende BWI	8121	25,1	50
	17.	1	M	RSV, griep, buikgriep, keelonsteking, 3x otitis	3491	38,1	72
	18.	4	M	Recidiverend ziek (viraal)	5789	43	91
	19.	<1	M	Bronchiolitis met recidiverende otitiden	nut (staal niet op ijs)	NA	NA
	20.	2	M	Recidiverende bronchopneumonie (4x)	reagens probleem	41,5	58
	21.	2	V	Persisterende otitis serosa	reagens probleem	56,7	80
	22.	3	V	Recidiverende pneumonie, pneumosepsis	reagens probleem	57,4	NA
	2024	23.	<1	V	Bronchiolitis	nut (staal niet op ijs)	46,3
24.		2	M	Recidiverende otitiden	50%*	67,7	86
25.		1	M	Otitis media	20%*	54,3	47
26.		<1	V	Recidiverende BWI	nut (staal niet op ijs)	NA	NA
27.		1	M	Recidiverende otitiden	nut (staal niet op ijs)	NA	NA

REFERENTIES

1. Nilsson B, Ekdahl KN. Complement diagnostics: Concepts, indications, and practical guidelines. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012.
2. Shih AR, Murali MR. Laboratory tests for disorders of complement and complement regulatory proteins. *Am J Hematol.* 2015;90(12):1180–6.
3. Willrich MA V., Braun KMP, Moyer AM, Jeffrey DH, Frazer-Abel A. Complement testing in the clinical laboratory. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2021;58(7):447–78. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408363.2021.1907297>
4. Brandwijk RJMGE, Michels MAHM, van Rossum M, de Nooijer AH, Nilsson PH, de Bruin WCC, et al. Pitfalls in complement analysis: A systematic literature review of assessing complement activation. *Front Immunol.* 2022;13(October).
5. Ding X, Qamar A, Liu H. The complement system testing in clinical laboratory. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2023;541(January):117238. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117238>
6. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP, Kuby J. *Kuby Immunology.* 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2013. 183–223 p.
7. Bossuyt X, J.-M. Boeynaems. Het complementsysteem. In: *Wegwijzer in laboratoriumdiagnose.* 2nd ed. Leuven: Garant; 2001. p. p447-451.
8. R. Benner, et al. *Medische immunologie.* Med Immunol. 2016;
9. Prohászka Z, Kirschfink M, Frazer-Abel A. Complement analysis in the era of targeted therapeutics. *Mol Immunol.* 2018;102(May):84–8.
10. Wong EKS, Kavanagh D. Diseases of complement dysregulation—an overview. *Semin Immunopathol.* 2018;40(1):49–64.
11. Ekdahl KN, Persson B, Mohlin C, Sandholm K, Skattum L, Nilsson B. Interpretation of serological complement biomarkers in disease. *Front Immunol.* 2018;9(OCT):1–15.
12. Brodzki N, Frazer-Abel A, Grumach AS, Kirschfink M, Litzman J, Perez E, et al. European Society for Immunodeficiencies (ESID) and European Reference Network on Rare Primary Immunodeficiency, Autoinflammatory and Autoimmune Diseases (ERN RITA) Complement Guideline: Deficiencies, Diagnosis, and Management. *J Clin Immunol.* 2020;40(4):576–91.
13. Monach PA. Complement. *Arthritis Rheumatol.* 2024;76(1):1–8.
14. Mollnes TE, Jokiranta TS, Truedsson L, Nilsson B, Rodriguez de Cordoba S, Kirschfink M. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol.* 2007;44(16):3838–49.
15. Skattum L. Clinical Complement Analysis—An Overview. *Transfus Med Rev* [Internet]. 2019;33(4):207–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.09.001>
16. Bossuyt X, Sneyers L, Marien G, Vranken G. Novel nephelometric assay for measurement of complement 3d. *Ann Clin Biochem.* 2002;39(1):34–8.
17. Vergani D, Bevis L, Nasaruddin BA, Mieli-Vergani G, Tee DEH. Clinical application of a new nephelometric technique to measure complement activation. *J Clin Pathol.* 1983;36(7):793–7.
18. Mohme M, Schliffke S, Maire CL, Rüniger A, Glau L, Mende KC, et al. Immunophenotyping of Newly Diagnosed and Recurrent Glioblastoma Defines Distinct Immune Exhaustion Profiles in Peripheral and Tumor-infiltrating Lymphocytes. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2018;clin.2017. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-17-2617>
19. Trolborg A, Jensen L, Deleuran B, Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Jensenius JC. The C3dg fragment of complement is superior to conventional C3 as a diagnostic biomarker in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2018;9(MAR):1–10.
20. Kim AHJ, Strand V, Sen DP, Fu Q, Mathis NL, Schmidt MJ, et al. Association of Blood Concentrations of Complement Split Product iC3b and Serum C3 With Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(3):420–30.
21. Nürnberger W, Bhakdi S. Plasma C3d/C3 quotient as a parameter for in vivo complement activation. *J Immunol Methods.* 1984;74(1):87–91.
22. Bergseth G, Ludviksen JK, Kirschfink M, Giclas PC, Nilsson B, Mollnes TE. An international serum standard for application in assays to detect human complement activation products. *Mol Immunol* [Internet]. 2013;56(3):232–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.221>
23. Zegers I, Schreiber W, Linstead S, Lammers M, McCusker M, Muñoz A, et al. Development and

- preparation of a new serum protein reference material: Feasibility studies and processing. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(6):805–13.
24. Zegers I, Keller T, Schreiber W, Sheldon J, Albertini R, Blirup-Jensen S, et al. Characterization of the new serum protein reference material ERM-DA470k/IFCC: Value assignment by immunoassay. *Clin Chem.* 2010;56(12):1880–8.
 25. Johnson AM, Whicher JT. Effect of certified reference material 470 (CRM 470) on national quality assurance programs for serum proteins in Europe. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39(11):1123–8.
 26. Lachmann PJ. Preparing serum for functional complement assays. *J Immunol Methods* [Internet]. 2010;352(1–2):195–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2009.11.003>
 27. Prohászka Z, Nilsson B, Frazer-Abel A, Kirschfink M. Complement analysis 2016: Clinical indications, laboratory diagnostics and quality control. *Immunobiology* [Internet]. 2016;221(11):1247–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2016.06.008>
 28. Yang S, McGookey M, Wang Y, Cataland SR, Wu HM. Effect of blood sampling, processing, and storage on the measurement of complement activation biomarkers. *Am J Clin Pathol.* 2015;143(4):558–65.
 29. Kirschfink M, Mollnes TE. Modern Complement Analysis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(6):982–9.
 30. Mollnes TE, Garred P, Bergseth G. Effect of time, temperature and anticoagulants on in vitro complement activation: consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1988;73(3):484–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2463123><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1541764>
 31. Levine L, Osler AG, Mayer MM. Studies on the Role of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ in Complement Fixation and Immune Hemolysis. *J Immunol.* 1953;71(5):374–9.
 32. LEVINE L, COWAN KM, OSLER AG, MAYER MM. Studies on the role of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ in complement fixation and immune hemolysis. I. Uptake of complement nitrogen by specific precipitates and its inhibition by ethylenediamine tetraacetate. *J Immunol* [Internet]. 1953 Nov;71(5):359–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13118173>