

## ESTUDIO PILOTO DEL EFECTO DEL TIPO Y CONSERVACION DE LA MUESTRA Y MÉTODO, EN LA MEDICION DE LA CONCENTRACION DE LAS FRACCIONES C3 Y C4 DEL COMPLEMENTO.

Soriuska Mayora Hernandez<sup>1</sup> , Wendy Martínez Vazquez<sup>1</sup> , Francis Crespo Serrano<sup>1</sup> ,  
Inirida Belisario Gomez<sup>1</sup> , Christian Medina García<sup>1</sup> , Juan Bautista De Sanctis<sup>2</sup> , Alexis García Piñero<sup>1</sup> .

<sup>1</sup>Instituto de Inmunología Dr. Nicolás Enrique Bianco Colmenares, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Caracas-Venezuela.

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Molecular y Translacional, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Palacky, 779 00 Olomouc, República Checa.

Mención Honorífica Premio SVBE XVII Congreso Venezolano de Bioanálisis 2023

Recibido para publicación 22 julio 2023. Aceptado: 30 septiembre 2023

### RESUMEN:

La determinación del complemento juega un papel importante en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades inflamatorias y de origen autoinmune, es por ello que a lo largo del tiempo los laboratorios han intensificado esfuerzos en desarrollar e implementar técnicas que permitan evaluar de manera eficiente estos biomarcadores. Recientemente se ha propuesto que, para el análisis de componentes individuales del complemento, debe usarse el plasma anticoagulado con ácido etilendiaminetetracético (EDTA), especialmente cuando se miden productos de activación, y que además la conservación de las muestras debe hacerse a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sin embargo, en Venezuela la mayoría de los laboratorios siguen utilizando muestras de suero y solo tienen disponibilidad de congeladores de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Es por ello que nos planteamos los siguientes objetivos: Comparar las concentraciones obtenidas para la determinación de C3 y C4 utilizando muestras de suero y plasma, evaluar el desempeño de las técnicas de nefelometría e inmunodifusión radial (IDR) para la determinación de las fracciones C3 y C4 del complemento y, por último, determinar el grado de afectación de la muestra, posterior al primer ciclo de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  y descongelación de las mismas. Para ello se evaluaron muestras de suero y plasma obtenidas de 12 individuos. Se evidenció que las muestras de plasma-EDTA mostraron mejor correlación entre ambas técnicas evaluadas, se confirmó la superioridad de la técnica de nefelometría sobre la IDR y se demostró que la prueba de C3 es menos sensible a la descongelación de las muestras que la determinación del C4.

**Palabras clave:** laboratorio, complemento, suero, plasma, nefelometría, inmunodifusión radial.

## PILOT STUDY OF THE EFFECT OF SAMPLE TYPE, SAMPLE CONSERVATION AND METHOD ON THE MEASUREMENT OF C3 AND C4 COMPLEMENT FRACTIONS CONCENTRATION.

### ABSTRACT

The determination of complement plays an important role in the diagnosis and follow-up of inflammatory and autoimmune diseases, which is why over time laboratories have intensified efforts to develop and implement techniques that allow efficient evaluation of these biomarkers. Recently, it has been proposed that for the analysis of individual complement components, plasma anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) should be used, especially when measuring activation products, and that samples should be stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . However, in Venezuela most laboratories still use serum samples and only have  $-20^{\circ}\text{C}$  freezers available. Therefore, we set the following objectives: to compare the concentrations obtained for the determination of C3 and C4 using serum and plasma samples, to evaluate the performance of nephelometry and radial immunodiffusion (RID) techniques for the determination of complement C3 and C4 fractions and, finally, to determine the degree of sample affectation after the first cycle of freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  and thawing of the samples. For this purpose, serum and plasma samples obtained from 12 individuals were evaluated. It was evidenced that the plasma-EDTA samples showed better correlation between both techniques evaluated, the superiority of the nephelometry technique over RID was confirmed and it was demonstrated that the C3 test is less sensitive to the thawing of the samples than the determination of C4.

**Keywords:** laboratory, complement, serum, plasma, nephelometry, radial immunodiffusion.

### Introducción

La determinación del complemento juega un papel importante en el diagnóstico y seguimiento de

enfermedades inflamatorias y de origen autoinmune, es por ello que a lo largo del tiempo los laboratorios han intensificado esfuerzos en desarrollar e implementar

**Solicitar copia a:** Soriuska Mayora Hernandez (soriuskamayora@gmail.com)

técnicas que permitan evaluar de manera eficiente estos biomarcadores (1).

El complemento (C) es un sistema complejo que comprende más de 30 proteínas que incluyen activación y regulación (2). Tradicionalmente se ha tratado de vincular estrechamente las respuestas fisiológicas y fisiopatológicas del complemento a vías y/o funciones efectoras individuales. Mientras tanto, sin embargo, emerge una imagen más refinada y dinámica de las funciones del complemento, en la que la suma de todas las firmas y estímulos activadores y reguladores dan forma a una respuesta general que típicamente involucra varias vías y efectores y activa varios mecanismos de diafonía (3).

Durante décadas, el uso principal y casi exclusivo de la determinación del complemento era detectar inmunodeficiencias primarias o para definir la actividad de enfermedades autoinmunes sistémicas, centrándose en un número limitado de trastornos reumatológicos o nefrológicos. Básicamente se utilizaron una serie de métodos para determinar las fracciones C3 y C4, mientras que la especificidad era importante no se prestaba especial atención a la sensibilidad de la técnica (4). Actualmente existen diferentes métodos comercialmente disponibles para medir la concentración de los componentes de las vías del complemento (clásica y alterna) y los factores reguladores. La inmunoelectroforesis de cohete y la inmunodifusión radial (IDR) permanecen en uso para la cuantificación de algunas proteínas del complemento; sin embargo, las técnicas de nefelometría, turbidimetría y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) son ahora más comunes para la cuantificación de proteínas del complemento (5). Hasta ahora, en Venezuela la muestra convencional para estos ensayos se trata de la muestra de suero, sin embargo, para su obtención es necesario esperar la retracción del coágulo para luego proceder a la centrifugación y separación de la muestra. La muestra pasa un tiempo indeterminado expuesta a la temperatura ambiente lo cual puede generar degradación o activación de las proteínas del complemento. Por otro lado, hay individuos en los que resulta difícil obtener un gran volumen de muestra en diferentes tubos de extracción, como es el caso de los pacientes pediátricos y los casos de personas cuya extracción sanguínea sea traumática.

Recientemente se ha propuesto que, para el análisis de componentes individuales del complemento, debe usarse el plasma anticoagulado con ácido

etilendiaminotetracético (EDTA), especialmente cuando se miden productos de activación. Usando el plasma-EDTA, cualquier activación adicional del complemento es minimizado (pero no completamente excluido) ya que el EDTA quela  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  bloqueando así la función del complejo C1 y las convertasas C3 (6).

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio fue comparar las concentraciones obtenidas para la determinación de C3 y C4 utilizando muestras de suero y plasma, así como determinar el grado de afectación de la muestra posterior al primer ciclo de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  y descongelación de las mismas.

### Metodología:

Se evaluaron 12 muestras obtenidas de pacientes quienes de manera voluntaria acudieron al servicio de laboratorio clínico del Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás Bianco C" para la determinación de las fracciones C3 y C4 solicitados como parte del plan diagnóstico de sus respectivos médicos tratantes. A cada paciente se le extrajo una muestra en un tubo seco (tapa roja) además de una muestra anticoagulada con EDTA (tubo tapa morada). Los tubos fueron centrifugados en frío para la separación de suero y plasma respectivamente.

Una vez obtenidas las muestras, estas fueron analizadas para la determinación de C3 y C4 mediante las técnicas de nefelometría e inmunodifusión radial. Para la determinación por nefelometría se utilizó el Analizador de proteínas semiautomático PA54 de la casa comercial Genrui (China), mientras que para el ensayo de inmunodifusión radial se emplearon placas de la marca LTA (Milano, Italia), ambas técnicas permiten el uso de muestras tanto de suero como de plasma.

Adicionalmente posterior a este primer ensayo las muestras fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un tiempo de una semana, para luego ser descongeladas y realizar una segunda determinación.

Para realizar el análisis estadístico se determinó la correlación de Pearson para cada una de las comparaciones realizadas en la evaluación de las concentraciones de C3 y C4, empleando el *software* Graph Pad Prism versión 5. Se graficaron las correlaciones entre las variables estudiadas, la línea sólida representa los valores promedio, mientras que las líneas punteadas son reflejo del rango desviación permitido.

**Resultados**

*Comparación de las muestras analizadas.*

Al comparar la concentración de C3 se puede observar un bajo grado de correlación entre ambas técnicas cuando la muestra analizada se trata de suero (ver figura 1), mientras que esta correlación mejora de manera considerable cuando la muestra estudiada es plasma. En el caso de la determinación de C4 se observó que ambas muestras tienen buena correlación con los métodos estudiados, sin embargo, la muestra de plasma muestra un aumento discreto en el coeficiente de correlación con respecto a la muestra de suero.

*Comparación del desempeño de las técnicas de nefelometría e IDR para la determinación de las fracciones C3 y C4 del complemento.*

El segundo objetivo de la investigación se trató de comparar el desempeño de los métodos de nefelometría e IDR al estudiar dos tipos de muestra, suero y plasma obtenido con EDTA. De forma similar a lo anterior se encontró que en el caso de la determinación por la técnica de nefelometría este mostro una correlación positiva entre ambos tipos de muestra para la determinación de C3, mientras que para la medición por IDR mostró una mejor correlación al usar muestras de plasma en vez de suero. La medición de concentraciones de C4 ambos tipos de muestras se comportan de manera similar al ser evaluadas tanto por nefelometría como por IDR. La técnica de nefelometría permite el uso de plasma para

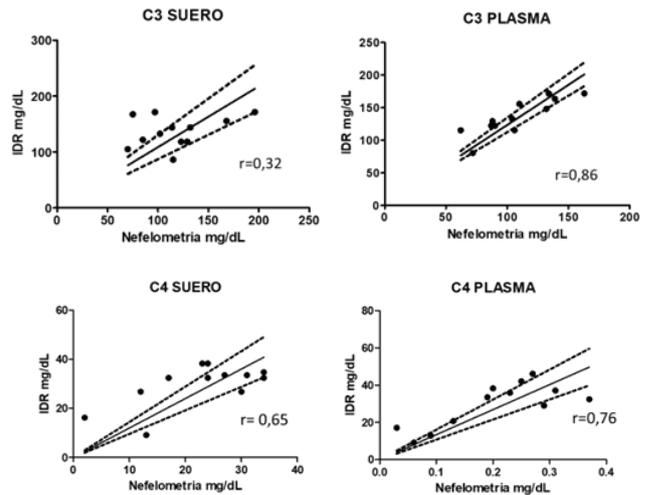


Figura 1: Correlación de los valores de concentración de las fracciones C3 y C4 del complemento evaluadas en muestras de suero y plasma, analizadas bajo las técnicas de nefelometría e IDR. n=12

evaluar C3 y C4, al igual que la determinación de C4 por IDR (ver figura 2).

*Comparación del efecto de la descongelación de la muestra.*

Por último, quisimos estudiar el efecto de un ciclo de descongelación en la medición de las concentraciones de C3 y C4 al evaluar muestras de suero y plasma bajo los métodos disponibles. Para ello, después de la

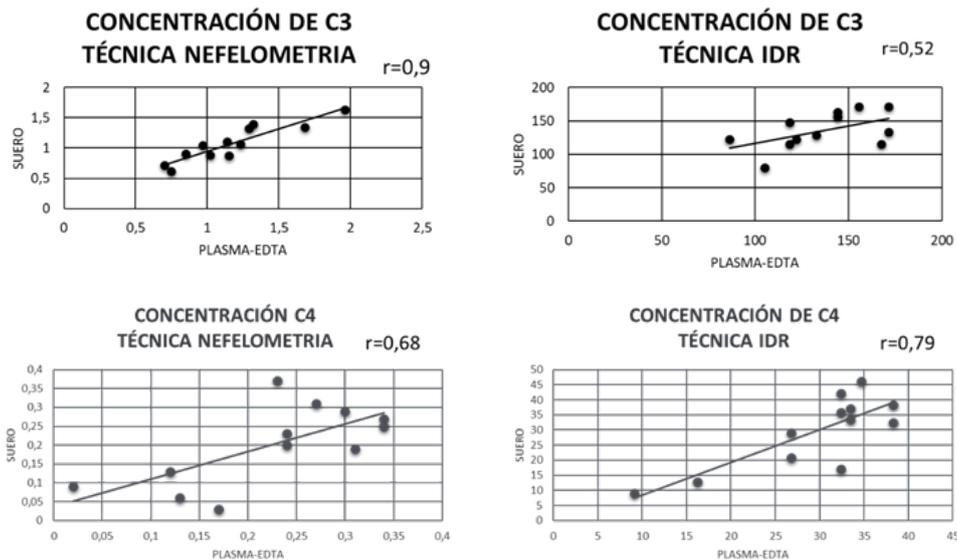


Figura 2: Comparación del desempeño de las técnicas de nefelometría e IDR para la evaluación de C3 y C4, al evaluar muestras de suero y plasma obtenido con EDTA n=12.

evaluación inicial, las muestras fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un lapso de una semana y transcurrido este tiempo se repitió la medición en una segunda corrida de las muestras. Al evaluar los resultados obtenidos encontramos que para C3 la muestra de plasma se comporta de manera similar a la original, mientras que para el C4 se observa una disminución de los valores de correlación entre la muestra original y la descongelada, sin embargo, es importante señalar que esta disminución ocurre en menor grado en la muestra de plasma. Por lo que se puede inferir que la muestra de plasma obtenido con EDTA resiste mejor el primer ciclo de descongelación de la muestra (ver figura 3). En

cuanto a la comparación de técnicas se observó que la técnica de nefelometría guarda mejor correlación entre los resultados obtenidos de las muestras frescas versus las muestras descongeladas (ver figura 4).

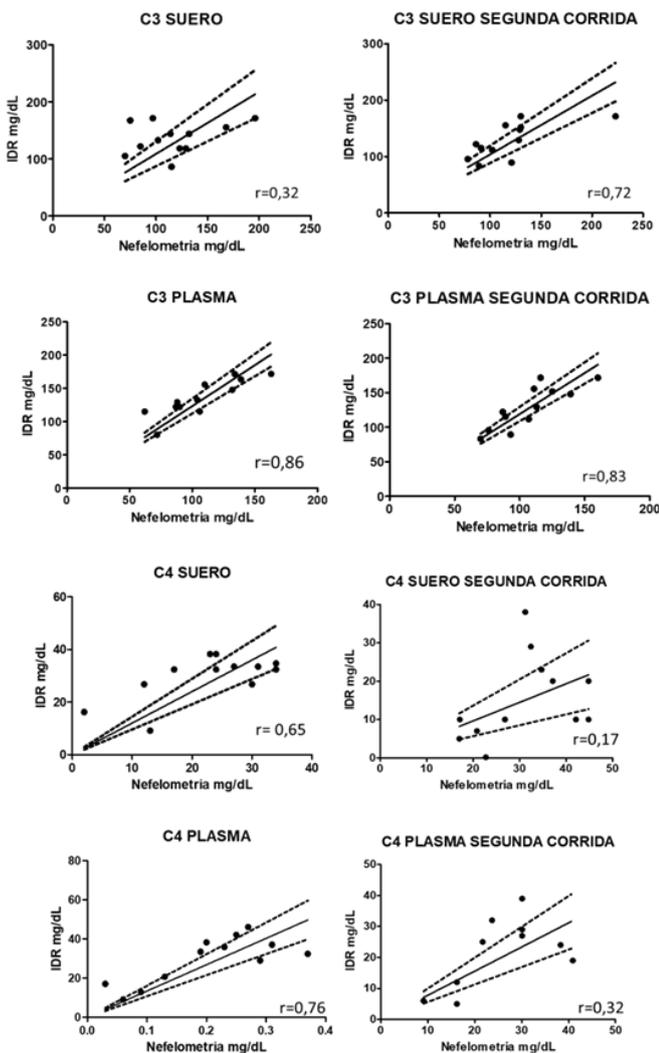


Figura 3. Comparación de los resultados de concentración obtenidos para las fracciones C3 y C4 del complemento medias antes y después de la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . n=12

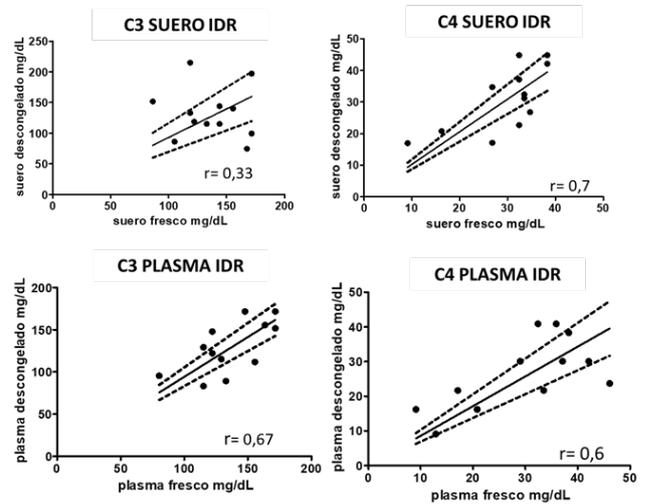


Figura 4. Comparación de las concentraciones obtenidas para la determinación del fragmento C3 del complemento mediante el análisis de muestras frescas y descongeladas por las técnicas de nefelometría e IDR. n=12

### Discusión

El estado del complemento de un paciente debe controlarse para evaluar diagnóstico en la deficiencia hereditaria o adquirida del complemento, para investigar la etiología de enfermedades con activación del complemento y para controlar los efectos de los fármacos reguladores del complemento.

Las enfermedades en las que más frecuentemente se indican pruebas del complemento son las siguientes: en el Síndrome Hemolítico Urémico atípico, la glomerulopatía C3, la glomerulonefritis postestreptocócica, para evaluar la gravedad y la posible inhibición del complemento en Lupus Eritematoso Sistémico y en el rechazo mediado por anticuerpos (7). Con el advenimiento de nuevas tecnologías se hace necesario mantener la revisión y actualización constante de las variables pre analíticas en el servicio de laboratorio clínico, varios factores relacionados con la muestra, el método, la plataforma o la calibración que, en conjunto, determinan las tasas de éxito; el campo de las pruebas de diagnóstico del complemento es especialmente sensible a varios de esos factores (8).

Aunque la temperatura recomendada para la conservación de muestras es la de  $-80^{\circ}\text{C}$ , este tipo de ultracongeladores no se encuentran disponibles en los laboratorios que practican la prueba, es por ello que la temperatura utilizada más comúnmente es la de  $-20^{\circ}\text{C}$ , a pesar de que algunos autores proponen que este tipo de conservación podría causar degradación del complemento (9). En nuestro estudio pudimos observar que la relación entre los valores obtenidos entre las muestras frescas y descongeladas se mantiene de mejor forma cuando la muestra analizada es plasma y la metodología usada es nefelometría. La concentración de proteínas individuales se determina mediante diversos tipos de inmunoensayos. El enfoque más común en la práctica clínica es utilizar ensayos de inmunoprecipitación, hoy en día principalmente nefelometría y turbidimetría. En estas últimas técnicas, se añaden a la muestra anticuerpos policlonales contra la proteína elegida (por ejemplo, C1q, C1INH, C4, C3 o factor B), formando complejos que distorsionarán un haz de luz detector que se hace pasar a través de la muestra (10). En Venezuela aún se sigue empleando la técnica de inmunodifusión radial, al ser una técnica más económica y sencilla ya que no necesita de equipos para su lectura e interpretación. Sin embargo, nuestro estudio demuestra que, aunque la IDR mantiene cierto nivel de correlación entre los parámetros estudiados la nefelometría se impone como una técnica superior. En cuanto a la muestra de elección para este análisis quedo demostrado que el plasma tiene un mejor desempeño que las muestras de suero, especialmente en la determinación de C3, en cuanto a este particular Vercauteren y col (2019) señalan que el proceso de degradación del C3 se produce rápidamente en el suero y se retrasa drásticamente en hielo y en presencia de EDTA (11). De forma similar a lo encontrado en nuestro estudio Yang y col en el año 2015 encontraron que cuando se recolectó sangre en tubos con EDTA, los factores del complemento, incluyendo C4d y C3a, fueron generalmente más estable durante el almacenamiento (12).

Esta investigación permitió examinar y actualizar algunas de las pautas para la fase pre analítica de una de las pruebas más solicitadas y sensibles en los laboratorios de inmunodiagnóstico, como lo es la determinación de las proteínas del complemento C3 y C4. Abre la puerta para un posible cambio de paradigma y ratifica la importancia de revisar constantemente los procesos del laboratorio clínico y de investigación en pro de ofrecer resultados que

sean un reflejo de la verdadera condición del paciente, especialmente hoy en día con el aumento vertiginoso del uso de muestras referidas desde laboratorio pequeños a laboratorios con mayor capacidad de servicio, en donde muchas de las veces no se toma en cuenta la temperatura y condiciones de conservación y transporte de las muestras hasta el momento final de su análisis.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos con las técnicas evaluadas demostraron que la determinación de C3 y C4 en el plasma favorece una evaluación más eficiente de dichos parámetros, dado correspondencia de valores con mayor exactitud en relación a la medición por IDR. demostró un mejor desempeño a la muestra de plasma demostró un mejor desempeño en cuanto estabilidad de los resultados obtenidos en las determinaciones de C3 y C4.

La técnica de nefelometría demostró mejor desempeño en la relación a otras técnicas, observándose resultados equivalentes independientemente del tipo de muestra evaluada.

Se evidenció la muestra de suero es más sensible al proceso de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  y descongelación, en relación a la muestra de plasma, observándose la pérdida de correlación entre los resultados obtenidos.

La proteína C4 independientemente de la técnica y tipo de muestra evaluado presenta mayor afectación con el proceso de congelación y descongelación. Este factor debe considerado como punto crítico en la determinación de los niveles de C4.

Se recomienda continuar este estudio con un mayor número de muestras que incluyan, muestras de voluntarios sanos y pacientes con diversas patologías que permitan determinar el comportamiento de las variables evaluadas en condiciones normales y cuando existe consumo del complemento.

## Referencias

1. Skattum L. Clinical Complement Analysis-An Overview. *Transfus Med Rev* 2019;33(4):207-216. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.09.001>.
2. Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickering MC, Würzner R, Tedesco F. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Mol*

- Immunol 2009;46(14):2774-2783. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.04.029>.
3. Pouw RB, Ricklin D. Tipping the balance: intricate roles of the complement system in disease and therapy. *Semin Immunopathol* 2021;43(6):757-771. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00281-021-00892-7>.
  4. Prohászka Z, Kirschfink M, Frazer-Abel A. Complement analysis in the era of targeted therapeutics. *Mol Immunol* 2018;102:84-88. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.06.001>.
  5. Willrich MAV, Braun KMP, Moyer AM, Jeffrey DH, Frazer-Abel A. Complement testing in the clinical laboratory. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2021;58(7):447-478. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10408363.2021.1907297>.
  6. Kirschfink M, Mollnes TE. Modern complement analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10(6):982-989. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/cdli.10.6.982-989.2003>.
  7. Lubka T. Roumenina. The Complement System. Innovative Diagnostic and Research Protocols. (electronic) Primera edición. *Methods in Molecular Biology (eBook)*. Series Editor John M. Walker, Springer Protocols. Switzerland AG 2021, 279p. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1016-9>.
  8. Frazer-Abel A, Kirschfink M and Prohászka Z. Expanding Horizons in Complement Analysis and Quality Control. *Front Immunol* 2021;12:697313. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.697313>
  9. Ekdahl KN, Persson B, Mohlin C, Sandholm K, Skattum L, Nilsson B. Interpretation of Serological Complement Biomarkers in Disease. *Front Immunol* 2018;9:2237. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02237>.
  10. Nilsson B, Ekdahl KN. Complement diagnostics: concepts, indications, and practical guidelines. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:962702. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2012/962702>.
  11. Vercauteren KOA, Lambrecht S, Delanghe J. Preanalytical classical and alternative complement pathway activity loss. *Biochem Med (Zagreb)* 2019;29(3):030701. Disponible en: <https://doi.org/10.11613/BM.2019.030701>.
  12. 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):558-565. Disponible en: <https://doi.org/10.1309/AJCPXPD7ZQXNTIAL>