

## Quimioluminiscencia: un nuevo método para la determinación de la concentración de ferritina sérica. Comparación con otros dos métodos

A. Enguix<sup>a</sup>, E. Urrechaga<sup>a</sup>, L. García<sup>a</sup>, M.<sup>a</sup> Teresa F. Coto<sup>b</sup>,  
M.<sup>a</sup> del Mar Hernández<sup>a</sup>

### Resumen

*Hemos evaluado la aplicación de un método inmunoluminométrico para la determinación de ferritina sérica.*

*Las imprecisiones intraserial e interserial fueron comparables a las del radioinmunoanálisis y enzimoimmunoanálisis a concentraciones medias, pero significativamente diferentes a concentraciones bajas y altas.*

*En cuanto a la inexactitud, se observaron variaciones importantes entre los tres métodos.*

*El estudio de las interferencias analíticas más importantes (hemoglobina y bilirrubina) no objetivó variaciones estadísticamente significativas a las concentraciones estudiadas.*

### Summary

*We have evaluated the application of an immunometric luminiscent methodology to the determination of serum ferritin.*

*Within-run and between-run imprecisions were similar to those of the radioimmunoassay and enzyme immunoassay methods at medium concentrations, but significantly different at low and high concentrations.*

*The evaluation of inaccuracy showed important variations between the three methods.*

*The study of analytical interferences (haemoglobin and bilirubin) did not show statistically significant variations at the concentrations studied.*

### Introducción

La determinación de la concentración de ferritina plasmática ocupa un papel clave en el diagnóstico de los trastornos del metabolismo del hierro, como fiel reflejo de las reservas corporales del mismo. Su principal utilidad consiste en el establecimiento del diagnóstico diferencial entre las anemias por déficit de hierro y otras causas de anemia (1-4).

Por otro lado su determinación también está indicada para el control evolutivo de ciertas neoplasias como el linfoma de Hodgkin, el carcinoma de mama o las leucemias agudas. Alteraciones de las concentraciones plasmáticas de ferritina se pueden encontrar asimismo en procesos inflamatorios y enfermedades hepáticas (1).

<sup>a</sup>Laboratorio de Análisis Clínicos. Hospital Carmen y Severo Ochoa. Cangas del Narcea. Asturias.

<sup>b</sup>Laboratorio de Análisis Clínicos. Hospital Nuestra Señora de Covadonga. Oviedo. Asturias.

Recibido 11-12-90

Aceptado 16-4-91

La ferritina constituye una forma soluble de almacenamiento de hierro en diversos tejidos corporales. Consiste de una envoltura proteica, o apoferritina, y un núcleo de hasta 4500 átomos de hierro. La apoferritina tiene una masa molecular relativa 480000 y está compuesta de 24 subunidades de dos tipos: H y L (5,6). La proporción de cada una de las subunidades en la molécula de ferritina es diferente en los distintos órganos. La forma presente normalmente en el plasma tiene un contenido relativamente bajo en hierro, y es compuesta predominantemente por subunidades L (6,7).

Desde la descripción, en 1972, del primer método para la determinación de ferritina plasmática (8), han sido varios los métodos desarrollados para la cuantificación de la misma. Entre ellos, los más importantes son: el radioinmunoanálisis y el enzimoimmunoanálisis.

Recientemente se ha comercializado un nuevo método inmunoquimioluminiscente para la cuantificación de ferritina plasmática. La inmunoquimioluminiscencia tiene como trazador un éster de acridino cuya ruptura produce energía lumínica cuantificable (10,11).

El objeto del presente trabajo es la comparación de los resultados por el método de inmunoquimioluminiscencia, con los obtenidos por otros dos métodos, habitualmente empleados en la determinación de la concentración de ferritina plasmática (radioinmunoanálisis y enzimoimmunoanálisis). Los estadísticos comparados entre los tres métodos han sido la inexactitud y la imprecisión de los mismos. Por otro lado, se ha realizado un estudio de interferencias analíticas (hemoglobina y bilirrubina) y una estimación del límite de detección en el método de inmunoquimioluminiscencia.

## Material y métodos

Para el estudio de la imprecisión intraserial e interserial se usaron tres mezclas de sueros previamente valorados por un método de enzimoimmunoanálisis (Ferrizyme, Abbott Laboratories, ref. 1364) con el que se obtuvieron las siguientes concentraciones: 3,72  $\mu\text{g/L}$  (mezcla de baja concentración), 42,29  $\mu\text{g/L}$  (mezcla de concentración media) y 303,12  $\mu\text{g/L}$  (mezcla de concentración alta). Se realizaron alícuotas de las mezclas y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

Para el estudio de inexactitud se usaron cuarenta sueros cuyas concentraciones de ferritina cubriesen la zona más amplia posible de concentraciones (1,3  $\mu\text{g/L}$ —1000  $\mu\text{g/L}$ ), divididos en tres grupos de valores (1,3  $\mu\text{g/L}$ —30  $\mu\text{g/L}$ ; 31  $\mu\text{g/L}$ —300  $\mu\text{g/L}$ ; 301  $\mu\text{g/L}$ —1000  $\mu\text{g/L}$ ).

Para el estudio del límite de detección se utilizó un calibrador comercial con una concentración de ferritina de 0  $\mu\text{g/L}$  (Maginc Fer; Ciba Corning, ref. 472329).

Para la inmunoquimioluminiscencia se utilizaron reactivos comerciales (Magic Lite; Ciba Corning, ref. 472754). Se trata de un método con doble anticuerpo monoclonal, donde el marcador es un éster de acridinio cuya ruptura no enzimática produce energía lumínica que es leída en un luminómetro. La calibración se hace mediante una curva de calibración para cada lote de reactivos, usan-

do sólo un calibrador de concentración baja y otro de concentración alta para cada serie analítica. En nuestro caso las concentraciones de los calibradores fueron de 3,7  $\mu\text{g/L}$  y 457  $\mu\text{g/L}$ . Para el enzimoimmunoanálisis se utilizó un reactivo comercial con doble anticuerpo monoclonal (Ferrizyme; Abbott Laboratories, ref. 1364). La calibración se llevó a cabo con 6 calibradores de concentraciones 10,50,100,200,400 y 800  $\mu\text{g/L}$ .

El radioinmunoanálisis se realizó con reactivos comerciales con doble anticuerpo monoclonal (Magic Fer; Ciba Corning, ref. 472329). Para la calibración se utilizaron 7 calibradores de concentraciones 0,5,20,50,200,500 y 1000  $\mu\text{g/L}$ .

## Estudio de interferencia

Para estudiar la interferencia provocada por la hemoglobina se añadieron a cada una de las tres mezclas de sueros dos soluciones con concentraciones de hemoglobina de 1,75 g/L y 5,00 g/L respectivamente, procedentes de un material de control comercial (Eightcheck-3wp; Sysmex ref. ECN-10).

Para el estudio de la interferencia producida por la bilirrubina se añadió a cada una de las tres mezclas de sueros una solución con una concentración de bilirrubina de 256  $\mu\text{mol/L}$ , procedente de un material de control comercial (Precibil; Boehringer Mannheim ref. 158046).

## Análisis estadístico

Para el estudio de comparación de la imprecisión intraserial e interserial para cada una de las tres concentraciones se usó la prueba *F* de Snedecor ( $n=20$ ).

Para el estudio de comparación de la inexactitud se utilizó el método de regresión lineal de Passing-Bablok.

En el estudio de interferencias se utilizó la prueba *t* de Student para muestras apareadas.

## Resultados

### Imprecisión

Las tablas I y II muestran los resultados obtenidos en los estudios de imprecisión intraserial e interserial para los tres métodos de las tres concentraciones. Los resultados obtenidos mediante la prueba *F* de Snedecor, realizada igualmente entre los tres métodos y para las tres concentraciones, muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres métodos para las concentraciones medias. Se observan, sin embargo, diferencias significativas tanto para la imprecisión intraserial como interserial a concentraciones bajas entre la inmunoquimioluminiscencia y el radioinmunoanálisis y enzimoimmunoensayo. A concentraciones altas se observan diferencias estadísticamente significativas para la imprecisión intraserial entre la inmunoquimioluminiscencia y el radioinmunoanálisis y enzimoimmunoanálisis.

**Tabla I**  
**Imprecisión intraserial para las tres concentraciones de ferritina sérica (n=20)**

	A		B		C	
	$\bar{x}(\mu\text{g/L})$	CV %	$\bar{x}(\mu\text{g/L})$	CV %	$\bar{x}(\mu\text{g/L})$	CV %
Quimioluminiscencia	8,34	6,5	36,97	3,1	279,1	3,0
Radioinmunoanálisis	3,26	3,7	35,60	3,9	327,0	5,9
Enzimoimmunoanálisis	3,72	8,2	42,29	3,8	303,1	5,6

A: Concentraciones bajas de ferritina sérica (0,3-30  $\mu\text{g/L}$ )  
 B: Concentraciones medias de ferritina sérica (31-300  $\mu\text{g/L}$ )  
 C: Concentraciones altas de ferritina sérica (301-1000  $\mu\text{g/L}$ )

**Tabla II**  
**Imprecisión interserial para las tres concentraciones de ferritina sérica (n=20)**

	A		B		C	
	$\bar{x}(\mu\text{g/L})$	CV %	$\bar{x}(\mu\text{g/L})$	CV %	$\bar{x}(\mu\text{g/L})$	CV %
Quimioluminiscencia	8,92	7,1	35,93	6,3	276,8	7,6
Radioinmunoanálisis	3,31	9,1	35,01	5,4	328,1	5,4
Enzimoimmunoanálisis	4,01	9,2	42,84	7,6	300,2	6,5

A: Concentraciones bajas de ferritina sérica (0,3-30  $\mu\text{g/L}$ )  
 B: Concentraciones medias de ferritina sérica (31-300  $\mu\text{g/L}$ )  
 C: Concentraciones altas de ferritina sérica (301-1000  $\mu\text{g/L}$ )

## Inexactitud

Las tablas III y IV muestran los resultados obtenidos en el estudio de regresión lineal de Passing-Bablok para los tres métodos y las tres concentraciones estudiadas. Se observan diferencias de inexactitud entre los tres métodos y las tres concentraciones, bien sea debido a diferen-

cias proporcionales, a diferencias constantes o ambas, excepto para radioinmunoanálisis y quimioluminiscencia a concentraciones altas y para radioinmunoanálisis y enzimoimmunoanálisis a concentraciones bajas y altas.

## Interferencias

No se encontraron interferencias para la hemoglobina ni para la bilirrubina a las concentraciones estudiadas (prueba *t* de Student).

## Límite de detección

El límite de detección fue de 0,64  $\mu\text{g/L}$  (calculado como  $\bar{x} + 2,2,33 s$  de los valores observados, para el calibrador con concentración de ferritina sérica de 0  $\mu\text{g/L}$ ;  $n=30$ ).

## Discusión

La determinación de la ferritina por métodos inmunológicos es afectada por su gran cantidad de isoformas, que poseen diferentes propiedades inmunológicas, así como por modificaciones postranslacionales como glucosilación o proteólisis parcial y su unión a proteínas transportadoras plasmáticas (13,14). Debido a estos hechos, y la falta de uniformidad de los calibradores utilizados, la estandarización en la determinación de la concentración

**Tabla III**  
**Estudio de regresión lineal de Passing Bablok. Radioinmunoanálisis / Quimioluminiscencia**

	Radioinmunoanálisis (x) / Quimioluminiscencia (y)
Concentraciones bajas de ferritina (0 - 30 $\mu\text{g/L}$ )	$y = 0,999x + 5,20$ i.c.m. 0,75 - 1,57 i.c.o. 2,89 - 6,19
Concentraciones medias de ferritina (31 - 300 $\mu\text{g/L}$ )	$y = 0,832x - 2,422$ i.c.m. 0,79 - 0,93 i.c.o. -9,41 - 1,36
Concentraciones altas de ferritina (301 - 1000 $\mu\text{g/L}$ )	$y = 0,970x - 20,690$ i.c.m. 0,85 - 1,20 i.c.o. -158,35 - 26,85

i.c.m. Intervalo de confianza (0,95) de la pendiente  
 i.c.o. Intervalo de confianza (0,95) de la ordenada en el origen

**Tabla IV**  
**Estudio de regresión lineal de Passing**  
**Bablok. Enzimoimmunoanálisis /**  
**Quimioluminiscencia**

	Enzimoimmunoanálisis (x) / Quimioluminiscencia (y)
Concentraciones bajas de ferritina (0 – 30 µg/L)	y = 1,078x + 3,406 i.c.m. 0,91–1,30 i.c.o. 1,80 – 4,76
Concentraciones medias de ferritina (31–300µg/L)	y = 1,103x – 4,515 i.c.m. 1,00–1,31 i.c.o. –22,55–5,00
Concentraciones altas de ferritina (301–1000 µg/L)	y = 1,304x – 76,432 i.c.m. 0,85–1,54 i.c.o. –209,5–(-23,61)

i.c.m. Intervalo de confianza (0,95) de la pendiente

i.c.o. Intervalo de confianza (0,95) de la ordenada en el origen

de ferritina sérica resulta bastante problemática (9,15).

La inmunoquimioluminiscencia permite la determinación de la concentración de ferritina sérica y es un método no isotópico que no precisa instalaciones especiales. La imprecisión obtenida con la misma es diferente a la de radioinmunoanálisis y enzimoimmunoanálisis excepto a valores medios de concentración de ferritina sérica. La inexactitud es asimismo diferente a la de los otros dos métodos estudiados excepto la de radioinmunoensayo a concentraciones altas de ferritina sérica. Estas diferencias de inexactitud pueden ser atribuibles a la diferente especificidad de los anticuerpos en los distintos métodos analíticos empleados y/o a la mencionada ausencia de un patrón de referencia uniformemente utilizado para la calibración, ya que para la misma se utilizan patrones distintos en cada uno de los métodos evaluados. No afectan, sin embargo, a la inexactitud de la inmunoquimioluminiscencia los fenómenos de interferencia provocados por la hemoglobina y la bilirrubina hasta unas concentraciones elevadas de las mismas.

La inmunoquimioluminiscencia es la técnica analítica que puede ser adecuada para la determinación de la concentración de ferritina sérica en laboratorios con pequeño número de especímenes, dada la ausencia de automatización en la misma, y que no puedan disponer de metodologías más mecanizadas. Las diferencias de inexactitud constatadas con otros dos métodos utilizados habitualmente hacen necesario el establecimiento de valores de referencia propios en el laboratorio usuario de la misma e impiden la intercambiabilidad de resultados con laboratorios que utilicen estos métodos, mientras no se establezcan patrones uniformes para la calibración de los mismos. Sin embargo, la imprecisión obtenida con la misma a bajas concentraciones de ferritina es, en general, suficiente para la detección de «ferropenia». Deben determinarse además las concentraciones séricas de hierro y transferrina, realizar porcentaje de saturación, etc.

## Bibliografía

1. Bauer JD. Hemoglobina, proferina y metabolismo del hierro. En: Kaplan-Pesce, dirs. Química Clínica. Teoría, análisis y correlación. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A., 1988: 721-773.
2. Jacobs A, Miller F, Worwood M. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. Br Med J 1972; 4: 206-210.
3. Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. New Eng J Med 1974; 290: 1213-1216.
4. Minchinela J, Aluma A, Casamajo T, Alsina MJ. Efectividad del hierro, transferrina y ferritina en el diagnóstico de las anemias microcíticas. Biochimica clínica 1989; 13: 749-751.
5. Harrison PM. The structures and function of ferritin. Biochem Educ 1986; 14: 153-162.
6. Worwood M. An overview of iron metabolism at a molecular level. J Intern Med 1989; 226: 381-391.
7. Worwood M. Serum ferritin. Clin Sci 1986; 70: 215-220.
8. Addison GM, Beamish MR, Hales CN. An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. J Clin pathol 1972; 25: 326-329.
9. Franco RS. Ferritin. En: Pesce-Kaplan, dirs. Methods in clinical chemistry. St Louis: Mosby Company, 1987: 1240-1242.
10. Strasurger CJ, Fricke H, Gadow A, Kligler W, Wood WG. Luminiscence Immunoassays alternatives to radioimmunoassay. Atzl Lab 1983; 29: 75-82.
11. Weeks I, Sturgess ML, Woodhead JS. Chemiluminiscence immunoassay: An overview. Clin Sci 1986; 70: 403-408.
12. Bablok W, Passing H. Application of statistical procedures in analytical instrument testing. J Automat Chem 1985; 7: 74-79.
13. Luzzago A, Arosio P, Iacobello C. Immunochemical characterization of human liver and heart ferritin with monoclonal antibodies. Biochim Biophys Acta 1986; 872: 61-71.
14. Cozzi A, Levi S, Bazziagaluppi E, Ruggeri G, Arosio P. Development of an immunoassay for all human isoforms of ferritin, and its application to serum ferritin evaluation. Clin Chim Acta 1989; 184: 197-206.
15. Iacobello C, Ghielmi S, Belloli S, Arosio P, Albertini A. Use of a reference standard to improve the accuracy and precision of seven kits for determination of ferritin in serum. Clin Chem 1984; 30: 298-301.