



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

ISSN: 1851-6114

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires  
Argentina

Loyola, Lourdes; Colimodio, María José; Furci,  
Aida; Giménez, María Isabel; Nardi, María Amelia  
Validación de un método analítico para cuantificación de ferritina en líquido cefalorraquídeo  
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 56, núm. 2, 2022, -Junio, pp. 139-148  
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires  
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53572377004>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso  
abierto

# Validación de un método analítico para cuantificación de ferritina en líquido cefalorraquídeo

► Lourdes Loyola<sup>1a,b\*</sup>, María José Colimodio<sup>1a,b</sup>, Aida Furci<sup>1b</sup>,  
María Isabel Giménez<sup>1b</sup>, María Amelia Nardi<sup>1a,b</sup>

---

<sup>1</sup> Bioquímica.

<sup>a</sup> Laboratorio Central. Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.

<sup>b</sup> Instituto Universitario del Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.

\* Autora para correspondencia.

## Resumen

La ferritina es una proteína de gran tamaño que se encuentra fisiológicamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en concentraciones de 2-10 ng/mL. Su elevación puede utilizarse como biomarcador en distintas condiciones patológicas. El procedimiento de validación tradicional para la medición en LCR no puede ser utilizado debido a la ausencia de controles y calibradores comerciales para esta matriz. El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo una validación analítica de ferritina en LCR. Se realizaron ensayos de estimación de precisión y veracidad mediante el protocolo EP15-A3, linealidad por el protocolo EP6-A (ambos de la guía de la CLSI), recuperación, estabilidad, contaminación por arrastre, interferencia por hemólisis y bilirrubina y límite de detección (LoD). La ferritina en LCR en el autoanalizador Dxl 800 de Beckman Coulter tuvo una *performance* intra e interensayo <3,7%, el ensayo denota linealidad en el intervalo de 2,1-547 ng/mL; se estableció estabilidad por un período de 5 días y la recuperación resultó ser aceptable. No se evidenció efecto de contaminación por arrastre ni interferencia por hemólisis hasta un rango entre 300-500 mg/dL de hemoglobina, ni interferencia por bilirrubina hasta una concentración de 16,0 mg/dL de bilirrubina total. El LoD fue de 0,4 ng/mL. Por medio de los ensayos realizados se logró validar la ferritina en LCR a partir de la utilización de *pools* de muestras, lo que pudo garantizar la confiabilidad y exactitud del método analítico.

**Palabras clave:** Líquido cefalorraquídeo; Ferritina; Validación analítica alternativa; Matriz alternativa

*Analytical method for validation of cerebrospinal fluid ferritin quantification*

## Abstract

*Ferritin is a large protein physiologically present in the cerebrospinal fluid (CSF) in concentrations of 2-10 ng/mL. Its elevation can be used as a biomarker in several pathological conditions. The traditional validation procedure for measurement in CSF cannot be used due to the absence of commercial controls and calibrators for this matrix. The objective of the present study was to perform CSF ferritin analytical validation. Assays such as precision and accuracy estimation through the EP15-A3 protocol, linearity according to the EP6-A protocol (both from the CLSI guidelines),*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

recovery, stability, carry-over, hemolysis and bilirubin interference and limit of detection (LoD) were conducted. Serum samples with different concentrations of ferritin were added to aliquots of a normal CSF pool. CSF ferritin in the Beckman Coulter Dxl 800 had a <3.7% intra and inter-assay performance, the assay shows linearity in the 2.1 -547 ng/mL interval, stability was established for a 5-day period and the recovery was acceptable. There was neither carry-over effect or hemolysis interference up to a range of 300-500 mg/dL of hemoglobin, nor interference by bilirubin up to 16.0 mg/dL of total bilirubin. The LoD was 0.4 ng/mL. By means of the performed assays, CSF ferritin was validated by using sample pools, thereby ensuring the reliability and accuracy of the analytical method.

**Keywords:** Cerebrospinal fluid; Ferritin; Alternative analytical validation; Alternative matrix

## Validação de um método analítico para quantificação de ferritina no líquido cefalorraquidiano

### Resumo

A ferritina é uma grande proteína fisiologicamente encontrada no líquido cefalorraquidiano (LCR) em concentrações de 2 a 10 ng/mL. Sua elevação pode ser usada como biomarcador em diferentes condições patológicas. O procedimento de validação tradicional para medição no LCR não pode ser usado devido à ausência de controles e calibradores comerciais para esta matriz. O objetivo deste estudo foi realizar uma validação analítica da ferritina no LCR. Foram realizados estudos de precisão e veracidade utilizando o protocolo EP15-A3, linearidade pelo protocolo EP6-A (ambos das diretrizes do CLSI), recuperação, estabilidade, contaminação transportada, interferência de hemólise e bilirrubina e limite de detecção (LoD). A ferritina no LCR no Dxl 800 da Beckman Coulter teve um desempenho intra e inter-ensaio <3,7%, o ensaio denota linearidade na faixa de 2,1-547 ng/mL, a estabilidade foi estabelecida em um período de 5 dias e a recuperação foi considerado aceitável. Nenhum efeito de transporte ou interferência por hemólise foi evidenciado até um intervalo entre 300-500 mg/dL de hemoglobina, nem interferência pela bilirrubina até uma concentração de 16,0 mg/dL de bilirrubina total. O LoD foi de 0,4 ng/mL. Através dos testes realizados, a ferritina no LCR foi validada, com base no uso de pool de amostras, o que poderia garantir a confiabilidade e a acurácia do método analítico.

**Palavras-chave:** Líquido cefalorraquidiano; Ferritina; Validação analítica alternativa; Matriz alternativa

## Introducción

La ferritina es una proteína hidrosoluble que se encuentra fisiológicamente en el suero de los seres humanos y en muy bajas concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR), en niveles de 2 a 10 ng/mL (1) (2). Una macromolécula como la ferritina, cuyo peso molecular es de 450 kDa, solo puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) en muy pequeña proporción, por lo que se espera que en presencia de una BHE intacta solo atraviese un 0,1% de esta proteína. Se cree que los niveles de ferritina que se encuentran basalmente en el LCR derivan mayoritariamente de la producción por células presentes en el sistema nervioso central (SNC) (3) (4). La ferritina, por su condición de proteína reactante de fase aguda, es un indicador de procesos inflamatorios o neoplásicos que afectan al SNC (1).

Desde hace algunos años, la elevación de la ferritina en LCR se propone como biomarcador en el diagnósti-

co de distintas situaciones patológicas del SNC, entre las cuales se encuentra la meningitis bacteriana, en la cual, debido a la alteración de la BHE, se observa un aumento de dicha proteína que puede servir como biomarcador (5) (6) (7). En estos casos, se propone utilizar un punto de corte de 15,6 ng/mL (sensibilidad 96,2% y especificidad 96,6%) (8). Asimismo, en situación de infiltración por células malignas también se observa un aumento de la ferritina en LCR, ya que son estas células las que aumentan la producción de ferritina intratecal; en esta situación, el punto de corte propuesto es 20 ng/mL (sensibilidad 76,4% y especificidad 52,2%) (9). La ferritina intratecal, en consecuencia, es un indicador muy temprano de infiltración maligna del SNC, ya que cuando las células neoplásicas migran hacia las leptomeninges lo hacen en cantidades tan pequeñas que no suelen producir alteraciones clínicas. Es difícil descartar la infiltración maligna por medio de la citología, pero puede dosarse esta proteína en LCR (1).

Finalmente, en casos de hemorragia subaracnoidea tardía existe un aumento en la síntesis intratecal de ferritina como respuesta a la degradación de hemoglobina con liberación del hierro, en cuyo caso se propone un punto de corte de 12 ng/mL (3). Es así que cuantificar la ferritina es muy útil cuando la hemorragia no es reciente y la tomografía computada pierde sensibilidad (10) (11).

La medición de esta proteína se considera sencilla y reproducible y se ha estudiado su utilidad como biomarcador, en conjunto con otras moléculas como, principalmente, la proteína C reactiva y el lactato en LCR (6).

Es sabido que toda metodología que se utilice en un laboratorio clínico y por la cual se emitan resultados de pacientes debe estar previamente validada según los estándares de calidad establecidos para cada país (12). En la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos argentinos, la metodología para dosar ferritina solo está validada para su determinación en suero. Sin embargo, para poder cuantificar esta proteína en LCR es necesario realizar una nueva validación, con el objetivo de asegurar que la medición no se vea afectada por el conocido "efecto matriz". Vale mencionar que este fenómeno puede traer resultados erróneos o de difícil interpretación (13) (14). No obstante, el procedimiento de validación tradicional no podría ser utilizado en LCR debido a la ausencia de controles y calibradores comerciales para este analito, propios de la matriz a estudiar (15). Es por ello que en el presente trabajo se propone como objetivo realizar una validación analítica alternativa para cuantificar ferritina en LCR.

## Materiales y Métodos

### Metodología

Se realizó una validación prospectiva de ferritina en LCR. Para ello se utilizó la metodología de inmuno-

ensayo por quimioluminiscencia de partículas paramagnéticas para la determinación cuantitativa de los niveles de ferritina en suero o plasma en el equipo DxI 800 (Beckman Coulter, Inc. 250 S Kraemer Blvd. Brea, CA 92821, EE.UU.). Es un ensayo inmunoenzimático tipo *sandwich*, en el cual la ferritina presente en la muestra se une a la anti-ferritina monoclonal inmovilizada en la fase sólida, mientras que el conjugado enzimático anti-ferritina de cabra reacciona con diferentes lugares antigénicos en las moléculas de ferritina. Tras la incubación y posteriores lavados, se añade el sustrato quimioluminiscente Lumi-Phos\*530 (marca registrada de Lumigen, Inc., subsidiaria de Beckman Coulter, Inc.) y se mide la luz generada por la reacción utilizando un luminómetro. La producción de luz es directamente proporcional a la concentración de ferritina presente en la muestra. La imprecisión (coeficiente de variación, CV%) total informada por el fabricante es menor de 10% y el CV% intraensayo es de 2,6%. El rango de medición analítico es de 0,2 a 1500 ng/mL (16).

### Materiales

Para realizar los estudios de validación se utilizaron dos *pools* de muestras de LCR normales (como criterio de inclusión para integrar el *pool* se consideraron LCR con menos de 10 células/mm<sup>3</sup>, menos de 50 eritrocitos/mm<sup>3</sup>, una concentración de proteínas totales entre 10-40 mg/dL y una concentración de glucosa entre 60-80 mg/dL).

Se muestran los flujogramas de preparación de ambos *pools* (Fig. 1). Con el *pool* N°1 de LCR se realizaron estudios de precisión, veracidad, linealidad, recuperación y estabilidad; para ello se fraccionaron en 3 alícuotas (A, B y C), adicionando concentraciones conocidas y elevadas de ferritina sérica a las fracciones B y C (Tabla I).

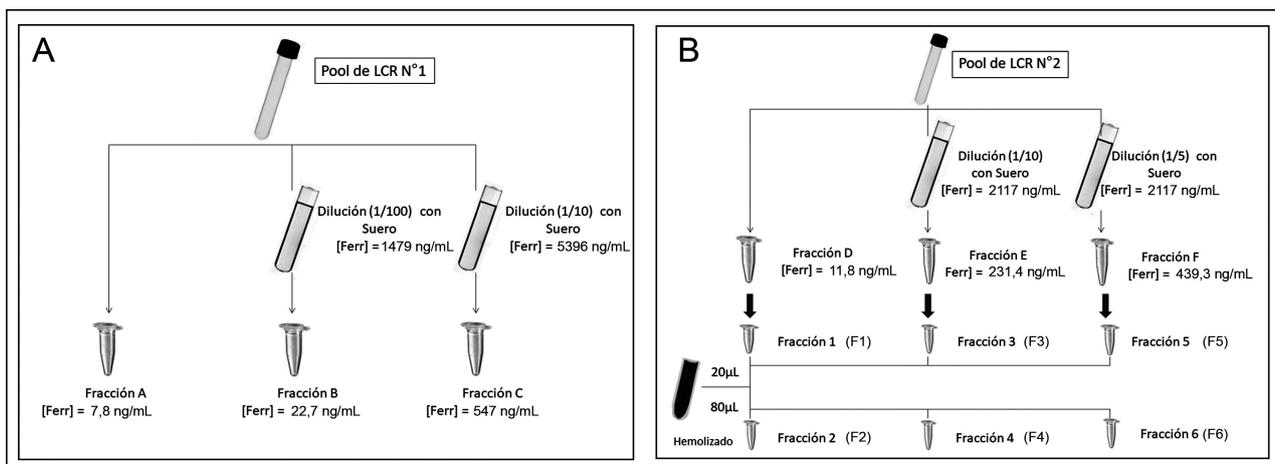


Figura 1. Representación esquemática para la realización de los *pools* N°1 (A) y N°2 (B)

Tabla I. Fracciones de trabajo y su modo de obtención para la realización de las distintas pruebas

Alícuota	Modo de obtención	Ferritina (ng/mL)
Fracción A	Pool de LCR N° 1	7,8
Fracción B	Dilución 1/100 (con el pool 1) de Fracción A con muestra sérica (1479 ng/mL)	22,7
Fracción C	Dilución 1/10 (con el pool 1) de Fracción A con muestra sérica (5396 ng/mL)	547,0
Fracción D	Pool de LCR N° 2	11,8
Fracción E	Dilución 1/10 (con el pool 2) de Fracción D con muestra sérica (2117 ng/mL)	231,4
Fracción F	Dilución 1/5 (con el pool 2) de Fracción D con muestra sérica (2117 ng/mL)	439,3

Por otro lado, para realizar estudios de contaminación por arrastre e interferencia por hemólisis, interferencia por bilirrubina y LoD, se utilizó un segundo pool (N° 2) de LCR a partir del cual se generaron tres fracciones (D, E y F) con diferentes concentraciones de ferritina (Fig 1) (Tabla I). Para obtener el valor verdadero se realizaron 20 determinaciones y se analizaron la media y la desviación estándar. Todas estas fracciones se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

#### Requisito de calidad utilizado

Existen diferentes fuentes disponibles para determinar el error total aceptable (ETa%) (17).

En el presente trabajo, el ETa% se estimó a partir de encuestas de evaluación externas de la calidad del Colegio Americano de Patólogos (CAP), método conocido como "Estado del Arte" (EA).

El valor se obtuvo a partir del coeficiente de variación ponderado (CVpp) de ferritina en suero durante el año 2017. Se realizó a partir de la fórmula:  $ETa\% = CVpp\% * 3$ . El CVpp se obtuvo como se detalla a continuación:  $CVpp = \frac{\sum(Ng * CVg)}{\sum Ng}$ , donde Ng es el número de laboratorios que pertenecen al grupo participante y CVg es el coeficiente de variación del grupo participante (18) (19).

#### Estudios o ensayos realizados

##### a) Precisión y veracidad

Se realizó a partir del protocolo de la guía EP15-A3 del CLSI (20), en donde el pool B se separó en 5 alícuotas, las que fueron congeladas a -20 °C. Cada día durante 5 días, se tomó una alícuota y se determinó por quintuplicado el valor de ferritina en LCR.

Se evaluó un único valor de decisión clínica, ya que en todos los casos, los valores de puntos de corte para el diagnóstico diferencial de las distintas patologías se encuentran cercanos a los 20 ng/mL.

##### a.1 Repetibilidad

Se estudió mediante la comparación del coeficiente de variación intracorrida ( $CV_R$ ) obtenido en este ensayo con el coeficiente intracorrida establecido por el fabricante ( $CV_{RF}$ ) y la expansión del valor permitido ( $UVL_R$ ) para ferritina en suero.

Criterios de aceptación: el  $CV_R$  debe ser menor que el  $CV_{RF}$ . En caso de que esto no se cumpla, el  $CV_R$  debe ser menor que el  $UVL_R$ .

##### a.2 Precisión intermedia

Se realizó a partir de la comparación del coeficiente de variación interdía ( $CV_{WL}$ ) con el propuesto por el fabricante para la ferritina en suero ( $CV_{WLF}$ ). Siguiendo el protocolo establecido, se adiciona el resultado correspondiente a la expansión del valor permitido ( $UVL_{WL}$ ).

Criterios de aceptación: el  $CV_{WL}$  debe ser menor que el  $CV_{WLF}$ . En caso de que esto no se cumpla, el  $CV_R$  debe ser menor que el  $UVL_{WL}$ .

##### a.3 Veracidad estadística

Se obtuvo la media a partir de las 25 determinaciones que se realizaron durante 5 días consecutivos. Los valores superior e inferior se obtuvieron aplicando el test de Student (t).

Criterio de aceptación: el valor medio obtenido debe encontrarse entre los valores inferior y superior del intervalo de aceptación generado a partir de la media objetivo.

##### a.4 Veracidad clínica

Se estudió a partir del cálculo del error sistemático admisible en unidades de concentración (ESacc), que resultó del 50% proveniente de la vinculación entre el requisito de la calidad y la media objetivo.

Criterio de aceptación: el ESacc debe ser menor que el ETa%.

##### b) Linealidad

Se determinó a partir del protocolo de la guía EP6-A del CLSI (21), en donde se realizaron diluciones del

*pool C* utilizando el *pool A* (dilución  $\frac{1}{4}$  con agua ultrapura tipo I), y de esta manera se obtuvieron diluciones seriadas de la muestra más concentrada. A cada alícuota se le determinó por triplicado el valor de ferritina en LCR.

Criterios de aceptación: obtención de una curva de primer orden. En caso de obtener un polinomio, ha de evaluarse el “error de no linealidad”. Éste no ha de superar el 50% del TEa.

#### c) Recuperación

Los valores esperados (teóricos) se obtuvieron a partir del cálculo de las diluciones realizadas al *pool C* (concentración 5) con el *pool A* (concentración 1). Se calcularon las concentraciones equidistantes y se obtuvo la concentración 4 (el 75% de la C5), la concentración 3 (el 50% de C5) y la concentración 2 (25% de C5). El porcentaje de recuperación se calculó a partir de la concentración esperada y la obtenida, según la siguiente fórmula:  $100 - [(\text{valor esperado} - \text{valor obtenido}) / \text{valor esperado}] * 100$ .

Criterio de aceptación: la diferencia porcentual debe ser inferior al 10% (13) (16) (22).

#### d) Ensayo de estabilidad

##### Estabilidad interdía

Se determinó la ferritina en LCR diariamente, por duplicado y durante 5 días a partir de una alícuota de la fracción B, la cual se mantuvo entre 4 y 8 °C. Se determinó el porcentaje de variación en comparación con el valor basal y se comparó con distintos criterios de calidad (23).

Los criterios propuestos para la evaluación de la estabilidad interdía se exponen a continuación:

- Criterio biológico (CSD): según variabilidad biológica en suero (CVb). CSD:  $\pm 0,5 * CVb$ .
- Criterio metrológico según la variación analítica interdía (CSM): utiliza los CVa% (coeficiente de variación analítico), correspondientes al período 2017. CSM =  $\pm 1,65 * CVa$ .
- ETa%: según requerimiento de calidad para el procedimiento de medida evaluado.

Criterio de aceptación: la variación porcentual con respecto al valor basal debe ser menor que el criterio de aceptación elegido.

#### e) Estudio de contaminación por arrastre

Se verificó la ausencia de arrastre entre muestras a partir del siguiente esquema de trabajo: se procesaron 3 alícuotas de la fracción D (concentración baja) de forma continua, seguidas de una alícuota de la fracción F (concentración alta) y luego se procesó nuevamente una alícuota de la fracción D. Se determinó la media y la desviación estándar de las primeras 3 alícuotas y se obtuvo un rango a partir de la media  $\pm 2$  desviaciones estándar.

Criterio de aceptación: el valor obtenido para la fracción D, luego de procesar la muestra con una concentración alta de ferritina, debe encontrarse dentro del rango propuesto anteriormente.

#### f) Interferencia: hemólisis

A fin de realizar el hemolizado, se tomó una muestra de sangre anticoagulada con EDTA tripotásico y se centrifugó a 15 000 r.p.m. durante 10 minutos en una microcentrífuga Combi 514R. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con solución fisiológica. Esta última etapa se repitió 3 veces. Se resuspendió el hemolizado en agua destilada ultrapura (Tipo I) y se congeló a -20 °C durante una noche.

Se generaron 6 fracciones como se detalla en la Fig. 1B.

La hemólisis fue evaluada en el equipo AU5800 Series Chemistry Analyzers (Beckman Coulter, Mishima, Japón). Las fracciones con baja hemólisis correspondieron a un rango de 50-99 mg/dL de hemoglobina y las de alta hemólisis a una concentración entre 300 y 500 mg/dL de hemoglobina.

Para determinar el valor aceptado se procesaron por triplicado las fracciones D, E y F (sin el agregado del hemolizado), así como el hemolizado puro. Se obtuvo la media de ferritina en cada una. Posteriormente se calculó la concentración final de ferritina de acuerdo a los volúmenes agregados de cada una (valor aceptado). Por otro lado, se determinó la concentración de ferritina a cada fracción (valor medido). Se determinó el rango permitido a partir del cálculo  $[(\text{valor medido} / \text{valor aceptado}) / \text{valor aceptado}] * 100$ , aplicando el ETa% como requisito de calidad para calcular el rango.

Criterio de aceptación: el valor medido debe encontrarse dentro del rango establecido según ETa%.

La metodología utilizada en el presente estudio se realizó de esta manera, y no evaluando la hemoglobina del hemolizado, ya que los contadores hematológicos disponibles en este laboratorio (DxH800 Beckman Coulter) cuentan con un sistema de detección de sangre para asegurar un resultado correcto sobre una muestra de sangre entera con EDTA. Si bien dichos contadores podrían procesar muestras de líquidos biológicos, la hemoglobina no es un parámetro medible en ese material; es así que el resultado de hemoglobina de una solución hemolizada distinta a la sangre entera podría no ser válido.

#### g) Interferencia: bilirrubina

Para evaluar el efecto de la presencia de bilirrubina en la determinación de ferritina en LCR se utilizaron las fracciones D y F, a las cuales se les agregaron distintas cantidades de una muestra de suero con altas concentraciones de bilirrubina.

La bilirrubina fue evaluada en el equipo AU5800 Series Chemistry Analyzers de Beckman Coulter. Se analizaron las fracciones por quintuplicado. Para la fracción

con baja concentración de bilirrubina se obtuvo una media de 3,8 mg/dL de bilirrubina total y para la fracción de concentración elevada, una media de 16,0 mg/dL de bilirrubina total.

Para armar los *pools* de bilirrubina, se adicionó la muestra con alta concentración de bilirrubina al *pool* de LCR basal, generando de esta forma dos fracciones con distinta concentración de bilirrubina.

Fracción G: dilución 1/40: 3,8 mg/dL de bilirrubina total

Fracción H: dilución 1/5: 16,0 mg/dL de bilirrubina total

De esta forma se generaron 4 fracciones:

- Fracción 1: Fracción D + Fracción G
- Fracción 2: Fracción D + Fracción H
- Fracción 3: Fracción F + Fracción G
- Fracción 4: Fracción F + Fracción H

Se analizó la concentración de ferritina de las fracciones G y H y de la muestra con alta concentración de bilirrubina. A partir de estos resultados y de las diluciones realizadas, se calculó el valor de ferritina en las fracciones 1, 2, 3 y 4 (valor aceptado). Por otro lado, se determinó la concentración de ferritina en las 4 fracciones utilizando el equipo Dxi 800 de Beckman Coulter (valor medido). Se determinó el rango permitido a partir del cálculo [(valor medido/valor aceptado)/valor aceptado]\*100. A este resultado se le aplica el requisito de calidad ETa% para obtener el rango.

Criterio de aceptación: el valor medido debe encontrarse dentro del rango establecido según ETa%.

#### h) Límite de detección

Se realizaron diluciones seriadas 1/10 a la Fracción D y se generaron 3 *pools* de concentraciones 0,8 ng/mL, 0,4 ng/mL y 0,2 ng/mL de ferritina. Cada *pool* fue analizado 20 veces.

Criterio de aceptación: detección de ferritina en LCR en el rango propuesto según ETa% en el 95% de las determinaciones (24).

## Resultados

### Materiales de estudio utilizados

Para el estudio inicial se analizaron los niveles de ferritina de las 6 fracciones que se utilizaron para los demás ensayos.

La concentración de ferritina obtenida en cada caso puede observarse en la Tabla I.

### Requisito de calidad utilizado

El valor del ETa% obtenido para ferritina fue de 23%, con: CV<sub>pp</sub>=7,67%, Ng=3848.

## Estudios/Ensayos realizados

### a) Precisión y veracidad

#### a.1 Repetibilidad

El CV% propio (2,8%) resultó ser mayor que el publicado por el fabricante (2,6%); sin embargo, la expansión del valor permitido (3,4%) fue mayor que el CV<sub>R</sub> obtenido, lo que determinó que la repetibilidad del ensayo fue aceptada estadísticamente.

#### a.2 Precisión intermedia

El CV<sub>WL</sub> resultó ser 3,7%, menor que el CV<sub>WLF</sub> propuesto por el fabricante (10%), con lo que se aceptó el ensayo.

#### a.3 Veracidad estadística

Debido a que la media obtenida de 23,5 ng/mL se encontraba entre los límites aceptados del rango 21,8 - 23,8 ng/mL se aceptó la veracidad estadística.

#### a.4 Veracidad clínica

El sesgo resultó ser 0,7 ng/mL, el cual fue menor que el ESA: 2,85 ng/mL; por ello se aceptó la veracidad clínica.

### b) Linealidad

En la Figura 2 se observó que el ensayo de linealidad arrojó una curva de primer orden, cuya ecuación de la recta es  $y=1,0008x - 0,5518$  en el rango estudiado que varía entre 2,1 y 547 ng/mL, por lo cual se puede asegurar que la determinación de ferritina en LCR, en el equipo utilizado y con las condiciones propias, es lineal en el rango estudiado.

### c) Recuperación

Como se observa en la Tabla II, en ninguna de las determinaciones el porcentaje de recuperación superó el 10% con respecto al valor teórico, con lo cual se aceptó el ensayo.

### d) Ensayo de estabilidad

#### Evaluación de la estabilidad interdía

Criterios propuestos: CSD: 7,45%; CSM: 11,4%; ETa%: 23%.

Como se observa en la Tabla III, las variaciones porcentuales, tomando como referencia el promedio de los resultados obtenidos el primer día, fueron todas inferiores al criterio de evaluación más estricto utilizado en este trabajo, el de CSD de 7,45%. Por lo tanto, se evidencia que las muestras son estables durante 5 días, almacenadas entre 4 y 8 °C.

### e) Estudio de contaminación por arrastre

El valor obtenido para la fracción D (11,8 ng/mL), luego de procesar la muestra con una concentración alta de ferritina (400,9 ng/mL) se encontraba dentro del intervalo propuesto de 11,2-12,4 ng/mL, lo que establece que no hubo efecto por arrastre.

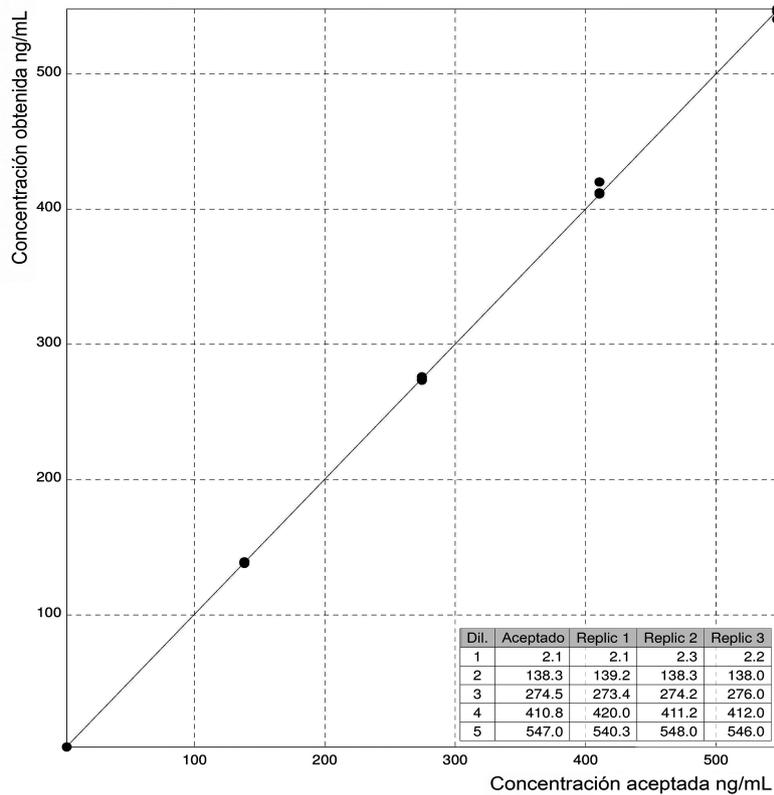


Figura 2. Rango lineal de ferritina en LCR mediante el protocolo EP6-A

Tabla II. Estudio de recuperación de ferritina en LCR

	Concentración aceptada (ng/mL)	Concentración obtenida (ng/mL)	% de recuperación
C1	7,8	7,8	-
C2	142,6	154,6	8,4
C3	277,4	296,3	6,8
C4	412,2	438,2	5,9
C5	547,0	584,7	6,5

Tabla III. Ensayo de estabilidad de la ferritina en LCR

	Repetición 1 (ng/mL)	Repetición 2 (ng/mL)	Promedio (ng/mL)	Variación %
Día 1	22,6	23,1	22,8	-
Día 2	23,8	23,3	23,5	3,1
Día 3	22,1	22,4	22,3	2,6
Día 4	21,7	23,7	22,7	0,6
Día 5	21,9	23,1	22,5	1,5

## f) Interferencia: hemólisis

No se evidenció interferencia por hemólisis hasta una concentración de hemoglobina en el rango de 300-500 mg/dL utilizando como requisito de calidad el EA. Los datos pueden observarse en la Tabla IV.

## g) Interferencia: bilirrubina

No se evidenció interferencia por bilirrubina hasta una concentración de bilirrubina total de 16,0 mg/dL utilizando el EA como requisito de calidad. Los resultados se detallan en la Tabla V.

Tabla IV. Estudio de interferencia por hemólisis

Concentración	Grado de hemólisis	Valor obtenido (ng/mL)	Valor aceptado (ng/mL)	Rango permitido (ng/mL)
Basal (Fracción D)	baja (F1)	11,8	12,9	9,9 - 15,8
	alta (F2)	12,9	16,0	12,3 - 19,7
Intermedia (Fracción E)	baja (F3)	211,7	230,1	177,2 - 283,0
	alta (F4)	249,9	226,2	174,2 - 278,2
Alta (Fracción F)	baja (F5)	412,2	435,7	335,5 - 535,9
	alta (F6)	445,0	439,3	337,9 - 540,7

Tabla V. Estudio de interferencia por bilirrubina

Concentración	Grado de ictericia	Valor obtenido (ng/mL)	Valor aceptado (ng/mL)	Rango permitido (ng/mL)
Basal (Fracción D)	baja (F1)	33,9	36,0	27,7 - 44,3
	alta (F2)	163,7	197,7	138,3 - 243,1
Alta (Fracción F)	baja (F3)	543,3	469,8	361,7 - 577,8
	alta (F4)	478,1	543,7	418,6 - 668,7

#### h) Límite de detección

En el presente trabajo se obtuvo un LoD de ferritina en LCR de 0,4 ng/mL. Esta concentración fue la que obtuvo un 95% de determinaciones dentro del rango permitido de acuerdo al requisito de calidad propuesto, en este caso EA. Los resultados se observan en la Tabla VI.

## Discusión y Conclusiones

Frente a la implementación de nuevos analitos en el laboratorio surge la necesidad de validar cada uno en la matriz a estudiar y esto no siempre es posible debido a la falta de controles y calibradores comerciales que se requieren para cumplir los procesos de validación estándares (18).

El rol del bioquímico resulta fundamental en el equipo de salud, garantizando que las metodologías utilizadas arrojen resultados confiables en pos de la seguridad del paciente (25). Debido al surgimiento de la ferritina en LCR como biomarcador de afección del SNC, el laboratorio tiene un rol clave en asegurar un resultado de calidad, sabiendo que el objetivo de todo profesional

del laboratorio es garantizar que los resultados emitidos sean precisos y veraces, independientemente del procedimiento y por supuesto, de su matriz (26). Es así que se adaptaron los protocolos pertinentes para poder realizar el proceso de validación del analito en la matriz deseada, logrando la puesta a punto de un método habilitado para emitir resultados confiables.

En este trabajo se detalla la validación de ferritina en LCR para el ensayo de quimioluminiscencia en el equipo DxI 800 de Beckman Coulter. Los estudios realizados incluyen precisión, veracidad y linealidad.

Asimismo, se realizaron ensayos adicionales de recuperación y de estabilidad, demostrando que las muestras pueden ser procesadas hasta 5 días después de la punción si son conservadas entre 4 y 8 °C. La verificación de la estabilidad interdía, y no solamente al último día, permite asegurar que la medición de ferritina en LCR en estas condiciones es estable en cada uno de los días ensayados. Esta información es de suma importancia cuando se trata de materiales biológicos que conllevan complejidad en la toma de muestra y, por este motivo, en la mayoría de los casos es considerada como única muestra. En este caso, si se solicita esta determinación los días subsiguientes a la toma de una muestra de LCR, es necesario garantizar que el resultado siga siendo confiable.

Tabla VI. Estudio del límite de detección de ferritina en LCR

Concentración de ferritina en LCR (ng/mL)	Rango permitido (ng/mL)	% de aceptación
0,8	0,72 - 0,98	100
0,4	0,31 - 0,49	95
0,2	0,16 - 0,24	80

Por otro lado, se ensayó contaminación por arrastre y se pudo comprobar que la presencia de altas concentraciones de ferritina no afectaba las mediciones posteriores. Esto es relevante debido a que en el laboratorio se utilizará el mismo equipo para realizar esta determinación tanto en LCR como en suero. También se incluyeron los estudios de interferencia por hemólisis y bilirrubina. El valor de estos ensayos radica en que es probable la obtención de una muestra de LCR hemolizada debido a una toma de muestra dificultosa o a la presencia de ictericia por una hemorragia subaracnoidea. La ausencia de interferencia en ambos casos posibilita brindar un resultado certero en cualquiera de estas dos condiciones.

Finalmente se estudió el LoD de ferritina en LCR, que si bien fue mayor al establecido por el fabricante para muestras de suero, no representa una diferencia clínicamente significativa, ya que los resultados obtenidos no serán tan bajos debido a que la producción basal en condiciones fisiológicas es de 2 a 10 ng/mL, como se mencionó anteriormente.

En cuanto al requisito de calidad empleado para este estudio, el calculado según el "Estado del Arte", resultó ser el que mejor se adaptó a la metodología empleada. Es de gran utilidad disponer de esta herramienta, ya que no siempre se cuenta con requisitos disponibles para todos los analitos. Este requisito se puede estimar a partir de controles de calidad internos o externos disponibles en todo laboratorio de análisis clínicos (18) (19). Sin embargo, utilizar requisitos de calidad propios de otra matriz (en este caso, suero) resulta una limitación para este estudio y para la implementación metodológica en sí, que deberá ser seguidamente resuelta a medida que se puedan recolectar datos para los cálculos correspondientes.

Por último, a pesar de lograr la validación del analito, para el procesamiento rutinario de esta metodología se generará la necesidad de contar con controles de calidad internos, los cuales actualmente no están disponibles en el mercado. En consecuencia, será necesario producirlos internamente en el laboratorio, a fin de lograr un monitoreo diario pertinente de este analito (18). Asimismo, sería importante contar con materiales de control externos para poder comparar los resultados con un grupo de pares, garantizando así un resultado estandarizado y preciso. No obstante, todavía este material no se encuentra disponible en ningún *test* de proficiencia para su estudio.

Es así que el advenimiento constante de nuevos marcadores para distintas situaciones fisiopatológicas en matrices diferentes al suero requiere metodologías versátiles pero a su vez robustas, que permitan la emisión de resultados con calidad analítica, de manera de contribuir al diagnóstico médico en forma oportuna. Para esto, la primera instancia se encuentra íntimamente relacionada con el proceso de validación/verificación analítica de

cada metodología. La complejidad de realizar una validación sin contar con controles ni calibradores propios de la matriz a estudiar puede resolverse mediante una validación alternativa y rigurosa. Ésta ha de considerar los estándares de calidad establecidos, con el objetivo de garantizar la confiabilidad y la exactitud del método analítico.

## Agradecimientos

Las autoras agradecen a las Bqcas. Susana Legal y Micaela Bellani, pertenecientes al sector de Calidad del Laboratorio del Hospital Italiano, por su ayuda durante la realización de la validación. También a la Dra. Marta E. Martinuzzo por ser una gran maestra en este camino.

## Fuentes de financiación

El presente trabajo fue realizado sin haberse recibido una financiación específica.

## Conflictos de intereses

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

## Correspondencia

Bioq. LOURDES LOYOLA  
Dirección: Tte. Gral. J.D. Perón 4190 - Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina  
CP: 1199 - Tel/Fax: 4959-0200  
Correo electrónico: docencia.laboratorio@hiba.org.ar

## Referencias bibliográficas

1. Sindic CJ, Collet-Cassart D, Cambiaso CL, Masson PL, Laterre EC. The clinical relevance of ferritin concentration in the cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1981; 44: 329-33.
2. Aviles A, Gómez R, Salas J. Ferritina en el líquido cefalorraquídeo como indicador temprano de afección neuromeningea en pacientes con linfoma maligno. *Gac Med Mex* 1991; 127: 249-52.
3. Wick M, Fink W, Pfister W, Einhäupl K, Huber M, Fateh-Moghadam A. Ferritin in cerebrospinal fluid differentiation between central nervous system haemorrhage and traumatic spinal puncture. *J Clin Pathol* 1988; 41: 809.
4. Almeida SM, Cunha DS, Yamada E, Ono M. Quantification of cerebrospinal fluid ferritin as a biomarker for CNS malignant infiltration. *Arq Neuropsiquiatr* 2008; 66: 720-4.
5. Sanaei Dashti A, Alizadeh S, Karimi A, Khalifeh M, Shoja SA. Diagnostic value of lactate, procalcitonin, ferritin, serum-C-reactive protein, and other biomarkers in bacterial and viral meningitis: a cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96: e7637.

6. Rezaei M, Mamishi S, Mahmoudi S, Pourakbari B, Kho-taei G, Daneshjou K, *et al.* Cerebrospinal fluid ferritin in children with viral and bacterial meningitis. *Br J Biomed Sci* 2013; 70: 101-3.
7. Kępa L, Oczko-Grzesik B, Stolarz W, Boroń-Kaczmarek A. Cerebrospinal fluid ferritin concentration in patients with purulent, bacterial meningitis—own observations. *Przegl Epidemiol* 2016; 70: 593-603.
8. Kim YO, Kang JS, Youm MH, Woo YJ. Diagnostic capability of CSF ferritin in children with meningitis. *Pediatr Neurol* 2003; 28: 271-6.
9. Dillman E, López Karpovitch X, Álvarez Hernández X, Hurtado R, Córdova MS, González Llaven J, *et al.* Ferritin and malignant hemopathies. I. Ferritin in cerebrospinal fluid as an indicator of central nervous system leukemic involvement. *Rev Invest Clin* 1982; 34: 95-8.
10. Petzold A, Worthington V, Appleby I, Kerr ME, Kitchen N, Smith M. Cerebrospinal fluid ferritin level, a sensitive diagnostic test in late-presenting subarachnoid hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2011; 20: 489-93.
11. Petersmann A, Kallner A, Preez H, Thein E, Dressel A. Diagnosis of late presenting subarachnoid hemorrhage: comparison of methods for cerebrospinal fluid ferritin. *Scand J Clin Lab Invest* 2014; 74: 524-6.
12. Westgard JO. *Prácticas básicas de control de la calidad*. Madison, WI: QC Westgard; 2013.
13. Shajani-Yi Z, Martin IW, Brunelle AA, Cervinski MA. Method validation of human chorionic gonadotropin and  $\alpha$ -fetoprotein in cerebral spinal fluid: aiding the diagnosis of intracranial germ cell tumors. *J Appl Lab Med* 2017; 2: 65-75.
14. Mitsios JV, McClellan A, Brown S, Gronowski AM. Human chorionic gonadotropin and  $\alpha$ -fetoprotein in cerebral spinal fluid: method validation and retrospective review. *Clin Biochem* 2014; 47: 632-5.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). EP14-A2 Evaluation of matrix effects: approved guideline. 2<sup>nd</sup> ed. Wayne, PA, EE.UU.: CLSI; 2005.
16. Beckman Coulter. Access immunoassays systems: instructions for use: access ferritin. Beckman Coulter; 2019. (A86486 L).
17. Data Innovations [Internet]. Allowable total error table. South Burlington, VT; [2020]. Disponible en: <https://datainnovations.com/allowable-total-error-table>. Fecha de acceso: 9 de abril de 2020.
18. Westgard JO. *Prácticas básicas de control de la calidad*. Madison, WI: QC Westgard; 2013.
19. Zirpoli MM, Adamczuk Y, Duboscq C. Requerimientos de calidad en hemostasia: variabilidad biológica *versus* estado actual de la metodología. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2016; 50: 300-3.
20. Carey RN, Durham AP, Hawk WW, Kallner A, Kondratovich MV, Midlle JG, *et al.* User verification of precision and estimation of bias; approved guideline, 3<sup>rd</sup> ed. Wayne, PA, EE.UU.: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. (CLSI document EP15-A3).
21. Tholen DW, Kroll M, Astles JR, Caffo AL, Happe TM, Krouwer J, *et al.* Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach, approved guideline. Wayne, PA, EE.UU.: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003. (CLSI document EPO6-A).
22. Centro Nacional de Metrología (CENAM). *Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico*. México DF: CENAM; 2008.
23. Alcaraz Quiles J, Rico Santana N, Bedini Chesa JL. Estabilidad de 27 magnitudes bioquímicas en muestras de suero conservadas en refrigeración. *Rev Lab Clín* 2014; 7: 9-16.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). EP17-A2 Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; Approved Guideline. 2<sup>nd</sup> ed. Wayne, PA, EE.UU.: CLSI; 2012.
25. McCay L, Lemer C, Wu AW. Laboratory safety and the WHO World Alliance for Patient Safety. *Clin Chim Acta* 2009; 404: 6-11.
26. Vesper HW, Miller WG, Myers GL. Reference materials and commutability. *Clin Biochem Rev* 2007; 28: 139-47.

**Recibido: 1 de junio de 2021**

**Aceptado: 9 de mayo de 2022**