

ARTÍCULO ORIGINAL

Comparación de dos métodos para la determinación de ceruloplasmina en un hospital pediátrico

Comparison of two methods for the determination of ceruloplasmin in a pediatric hospital

Grau, María Emilia^{1*}; Procopio, Domingo¹; Collini, Mariana Beatriz¹

¹Laboratorio Central, Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría "Sor María Ludovica". La Plata, Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Grau, María Emilia. Laboratorio Central, Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría "Sor María Ludovica", Calle 14 n°1651, La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina; emigrau28@gmail.com.

Resumen

Introducción: La ceruloplasmina es una enzima que usa cobre como cofactor. La utilidad de su determinación es diagnosticar las enfermedades de Wilson y Menkes en las cuales se encuentra principalmente como forma inactiva por el bajo cobre circulante. Sin embargo, dicha determinación puede considerar solo la porción activa o la medición de su concentración proteica. Esto hace que los métodos que miden concentración puedan sobreestimarla y perder sensibilidad diagnóstica. **Objetivo:** Evaluar la correlación y concordancia entre un método enzimático y un método inmunoturbidimétrico para medir ceruloplasmina. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio observacional, analítico comparando el método enzimático de Henry y col. y el método inmunoturbidimétrico CERU® (Roche, Cobas c311) para la determinación de ceruloplasmina, utilizando muestras de suero de pacientes pediátricos con solicitud médica para esta determinación, en el período de abril de 2018 – marzo de 2021. El análisis estadístico (IBM SPSS Statistics versión 21) consistió en un estudio de correlación (Pearson) y un estudio de concordancia (Bland - Altman). **Resultados:** Se analizaron 51 muestras y se obtuvo un $r = 0,916$ en la correlación de Pearson ($p < 0,0001$) y una gráfica de Bland - Altman con sesgo positivo. **Conclusión:** Se evidenció buena correlación, aunque el análisis de concordancia muestra sesgo positivo. Debido a que en la zona de decisión médica la concordancia es buena, se concluye que ambas metodologías pueden ser intercambiables.

Palabras clave: ceruloplasmina, comparación de métodos, actividad enzimática, concentración proteica, correlación, concordancia, cobre.

Abstract

Introduction: Ceruloplasmin is an enzyme that uses copper as a cofactor. It can be determined in the laboratory by determining its enzymatic activity, which considers only the active portion, or by measuring its protein concentration, which considers both the active and inactive portion. Ceruloplasmin is useful in diagnosing Wilson's and Menkes' diseases, in which it is found mainly as an inactive form due to low circulating copper. This means that methods that measure concentration can overestimate it and lose diagnostic sensitivity. **Objective:** To evaluate the correlation and concordance between an enzymatic method and an immunoturbidimetric method to measure Ceruloplasmin. **Materials and methods:** An analytical observational study was carried out to compare the enzymatic method of Henry et al. and the CERU® immunoturbidimetric method (Roche, Cobas c311) for the determination of Ceruloplasmin, using serum samples from pediatric patients, with medical request for this determination, in the period April 2018 - March 2021. The statistical analysis performed (IBM SPSS Statistics version 21) consisted of a correlation study (Pearson) and a concordance study (Bland Altman). **Results:** 51 samples were analyzed, obtaining $r=0.916$ in the Pearson correlation ($p < 0.0001$) and a Bland Altman graph with positive bias. **Conclusion:** A good correlation was found, although the concordance analysis showed a positive bias. Since the agreement is good in the medical decision area, it is concluded that both methodologies can be interchangeable.

Key words: Ceruloplasmin, comparison of methods, enzymatic activity, protein concentration, correlation, concordance, copper.

Introducción

La ceruloplasmina (ferroxidasa - I, EC 1.16.3.1.) es una proteína de fase aguda y de transporte que se sintetiza en el hígado.^{1,2} A pesar de que se ha contemplado por mucho tiempo como un transportador de cobre, su principal función es la actividad ferroxidasa, que, oxidando el hierro ferroso, lo transforma en férrico, utilizando el cobre como cofactor enzimático.^{1,2,3}

Entre las patologías en las cuales se ve alterada la ceruloplasmina, se encuentran la enfermedad de Wilson (degeneración hepatolenticular) y la enfermedad de Menkes (defecto congénito en la absorción de cobre).^{1,3} Los pacientes con enfermedad de Menkes tienen una supervivencia de 2 a 3 años, sin embargo, la supervivencia en la enfermedad de Wilson depende de un diagnóstico oportuno.^{1,4} Es por esto que resulta crucial contar con un ensayo de calidad para determinar la ceruloplasmina.

Existen diversos métodos para la determinación en el laboratorio de la ceruloplasmina. El método más recomendado, que data de la década de los 60, es la determinación de la actividad enzimática.⁵⁻⁷ Este método mide la holoceruloplasmina (porción biológicamente activa, cargada de cobre).^{6,8,9} El mismo tiene buena sensibilidad y especificidad, pero, al tratarse de una técnica manual, demanda mucho tiempo y requiere de un operador entrenado.

En la actualidad, el desarrollo y la aplicación de ensayos inmunológicos disponibles comercialmente es cada vez mayor en los laboratorios clínicos. Generalmente, para detectar ceruloplasmina en suero, se utiliza nefelometría automatizada o inmunoturbidimetría.¹⁰ A diferencia del método recomendado (actividad enzimática), estos ensayos inmunológicos miden tanto la holoceruloplasmina como la apoceruloplasmina (porción no funcional).^{9,11}

Tanto en los pacientes con enfermedad de Wilson como en aquellos con enfermedad de Menkes, la concentración de cobre circulante es baja. Esto aumentaría la proporción de apoceruloplasmina, por lo que podrían obtenerse resultados no comparables entre ambas metodologías.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la correlación y concordancia entre el método enzimático recomendado y un método inmunoturbidimétrico para la determinación de ceruloplasmina. La importancia radica en conocer si este nuevo método inmunoturbidimétrico puede reemplazar al método de referencia brindando al médico y paciente información clínica de calidad para arribar al diagnóstico de forma temprana, evitando complicaciones y, al mismo tiempo, disminuir los tiempos de procesamiento de las muestras.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio observacional, analítico para el cual se utilizaron muestras de suero de niños con solicitud de ceruloplasmina que concurren al Laboratorio Central del Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría (HIAEP) "Sor María Ludovica" de La Plata en el período de abril de 2018 - marzo de 2021. Se excluyeron las muestras

con volumen insuficiente para ser procesadas por ambas metodologías y, de aquellas que pertenecían al mismo paciente, se incluyó solo la muestra más actual.

Las muestras fueron analizadas por el método enzimático de Henry y col.⁵ modificado y el método inmunoturbidimétrico CERU® (Roche, Cobas c311). El método enzimático modificado consistió en la utilización de p-fenilendiamina en HCl al 0,25% como sustrato en tampón de acetato 0,1 M. Se utilizó como blanco de reactivo azida de sodio al 0,1% en el mismo tampón de acetato. Se trabajó a 25°C con lecturas a 546 nm, utilizando espectrofotómetro de simple haz.

Se utilizó como control de calidad para ambos métodos el PreciControl ClinChem Multi2 (Roche) con valor medio de 25,7 mg%.

Los datos demográficos de la población se obtuvieron a través del Sistema Informático de Laboratorio (LIS) de Wiener® y de planillas de trabajo del Sector Metabolopatías del Laboratorio Central. Los mismos se volcaron en planillas de Microsoft Excel®.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa IBM SPSS Statistics versión 21 ($p < 0,05$).¹² En una primera instancia, se realizó la búsqueda y eliminación de los *outliers*. Para esto, se usó la distancia de Mahalanobis para análisis multivariado y se convirtió a probabilidad ($p < 0,05$).

Se utilizó la prueba de Kolmogorov - Smirnov para una muestra ($p < 0,05$), para conocer la distribución de datos. La correlación se realizó a través del estudio de Pearson ($p < 0,05$)¹³ entre el método considerado como referencia [actividad enzimática] y el inmunoturbidimétrico [método de estudio]. Además, se representó gráficamente la dispersión de datos.

El análisis de concordancia se llevó a cabo mediante la gráfica de Bland - Altman aplicando línea de tendencia central.

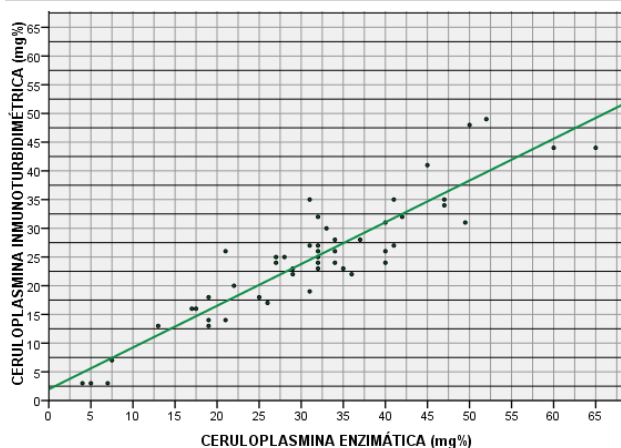
Por último, se calculó el coeficiente de variación porcentual (CV%) obtenido por cada método para comparar *performance*.

Resultados

Se analizaron un total de 51 resultados de ceruloplasmina determinados tanto por el método enzimático como por el inmunoturbidimétrico en el período de abril de 2018 - marzo de 2021. El 22 % de las muestras (12) corresponde a pacientes de género femenino y el 78 % (39), a pacientes de género masculino. Respecto de la localización, el 25 % de los niños (13) se hallaba hospitalizado al momento de la toma de muestra, el 69 % (35) concurren de manera ambulatoria al Laboratorio Central y el 6 % restante (3) corresponde a muestras derivadas de un centro de menor complejidad. La mediana de edad de los pacientes incluidos fue de 4 años (0 - 13 años). La población estudiada consistió en pacientes con sospecha de enfermedad de Wilson o Menkes, o familiares de primer grado de pacientes ya diagnosticados, aunque no se contó con el diagnóstico de toda la población por lo que no se pudo realizar un análisis estadístico de dichos datos. No se estudiaron pacientes potencialmente sanos.

La distancia de Mahalanobis evidenció la presencia de

Figura 1. Representación de la dispersión de datos con línea de tendencia central.



un *outlier*, el cual fue eliminado, por lo que se utilizaron 50 resultados para el análisis estadístico. Se usó la prueba de Kolmogorov - Smirnov para una muestra ($p < 0,05$) para conocer la distribución de datos, y se obtuvo una distribución normal, por lo que se pudo utilizar para la correlación el coeficiente de Pearson, que dio un valor $r = 0,915$. Además, se graficó la dispersión de datos, que muestra tendencia recta (Figura 1). De forma previa a realizar el análisis estadístico, se convirtió la actividad enzimática obtenida por el método de Hery y col. a concentración utilizando la base de datos de enzimas BRENDA.¹⁴ Luego, con los datos obtenidos, se realizó un gráfico de Bland - Altman,¹⁵ para conocer la correlación a distintos rangos de concentración y evaluar así si existe concordancia (Figura 2).

Se aplicó tendencia lineal al gráfico de Bland - Altman y se obtuvo una recta con pendiente positiva, con un $R^2 = 0,290$.

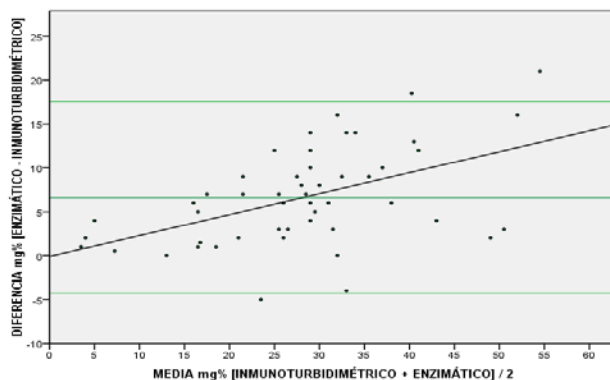
Se alcanzó un CV% del 12 % para el método manual y del 5,9 % para el método automatizado.

Discusión

En el presente trabajo, se evidenció una correlación estadísticamente significativa entre el método inmunoturbidimétrico y el enzimático para la determinación de ceruloplasmina. Esto no se evidencia en los estudios publicados, que establecen la sobreestimación de los valores obtenidos con el método inmunoturbidimétrico (especialmente en los grupos con enfermedad de Wilson y Menkes), ya que mide también holoceruloplasmina.^{16,17}

Es importante contemplar que la diferencia en correlación obtenida entre los distintos trabajos y el presente está influenciada por la *performance* de la metodología utilizada. Es decir, existen distintos tipos de técnicas inmunoturbidimétricas y enzimáticas que cuentan con sensibilidad, especificidad, límite de detección e interferencias diferentes. Además, al ser el método enzimático manual, hay que considerar el error propio del operador y de la metodología por su reproducibilidad. Esto último se evidencia comparando el

Figura 2. Representación de Bland - Altman con línea de sesgo.



► La recta horizontal central marca la media de las diferencias, mientras que las rectas horizontales que se encuentran a ambos lados representan ± 1.96 DS. DS, desvío estándar.

coeficiente de variación obtenido por el método manual (12 %) y el automatizado (5,9 %).

Al contrario de lo esperado, al analizar los datos, se puede observar que el valor obtenido por el método inmunoturbidimétrico fue menor que el del enzimático. Esto se evidencia en la gráfica de Bland - Altman, la cual presenta un sesgo positivo que señala una diferencia positiva entre los valores obtenidos por el método de referencia (enzimático) y el inmunoturbidimétrico (Figura 2). Además, este sesgo es menor a concentraciones más bajas (el análisis de sesgo da una recta con pendiente positiva), lo cual no afecta la utilidad clínica, ya que los valores de toma de decisión médica son aquellos en los que la concentración está por debajo del límite de referencia (19 - 39 mg%).¹³ Una posible explicación a la diferencia observada podría deberse al instrumental utilizado, ya que se cuenta con un espectrofotómetro de simple haz, por lo que no existe blanco de reacción: debido a que el sustrato se oxida lentamente con la luz, además de la oxidación propia de la muestra, podría ser una causa de la sobreestimación de los valores obtenidos por el método enzimático. Esto podría corregirse utilizando un espectrofotómetro de doble haz.

A pesar de que el análisis estadístico indica que hay correlación entre ambos métodos y que el sesgo positivo evidenciado tiene escaso efecto en los rangos de decisión clínica, resulta importante señalar algunas de las limitaciones del presente estudio.

Una de las limitaciones de este estudio radica en que no se pudo evaluar el método sobre una población potencialmente sana, por lo que, aun considerando solo aquellos resultados dentro del rango de referencia utilizado en el Laboratorio Central del HIAEP "Sor María Ludovica", no es suficiente para evaluar cómo correlacionan ambos métodos en dichos pacientes. Tampoco es suficiente el número de pacientes afectados con estas enfermedades (Wilson y Menkes) incluidos en este trabajo para evaluar si la correlación se ve modificada en los distintos grupos de patologías,

como se evidencia en los estudios previamente publicados.^{16,17}

Otra de las limitaciones observadas es que, aunque el número de muestras utilizado es suficiente para realizar un análisis estadístico, el mismo sigue siendo pequeño, y existe la posibilidad de considerar que un nuevo método es adecuado aun cuando no lo sea. Se recomienda que los estudios de correlación y concordancia tengan al menos 100 individuos/muestras.¹⁵

Por todo lo mencionado anteriormente, resultaría interesante realizar más estudios que involucren un número de muestras mayor y que cuenten con pacientes potencialmente sanos y enfermos (especialmente con Wilson y Menkes).

Sin embargo, debido a la rapidez, precisión y fácil automatización y a los resultados estadísticos obtenidos en este trabajo, que avalan su utilización, el método inmuno-turbidimétrico podría ser usado con carácter diagnóstico y, consecuentemente, reemplazar al método enzimático de referencia.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. María Victoria Fasano por su colaboración en la revisión del diseño metodológico y el análisis estadístico del presente trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no poseer conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Cormenzana JC. Hemocromatosis, Alteraciones del metabolismo del cobre y déficit del cofactor de molibdeno. En: Sanjurjo P, Baldellou A. Diagnóstico y tratamiento de enfermedades metabólicas hereditarias. 3era Edición. Madrid: Ergon; 2010, p 1039-1052. DOI: 10.1157/13124906.
- Zena Leah H. Ceruloplasmin. En: Kerker N, Roberts EA. Clinical and Translational Perspectives on Wilson Disease. California: Academic Press; 2019. p 77-84. ISBN: 9780128105320.
- Servin R, Bay L, Eiroa H, Avalo M, Braverman A, Zappa J, et al. Enfermedad de Menkes: Presentación de un caso y revisión bibliográfica. Arch. argent. Pediatr. 1991; 89 (6): 274-281. LILACS: lil-560320.
- Yapur VM, Bustos MF, González AS, Negri GA. Ceruloplasmina: determinación de su actividad ferroxidasa. ABCLDL. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2007; 41(3): 347-351. ISSN: 0325-2957.
- Henry RJ, Chiamori SL, Segalove JM. Determination of Ceruloplasmin Oxidase in Serum. Exp Biol Med. [Maywood] 1960; 104 (4): 300-312.
- Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, Smith AL, Wall AJ, Sewell RB. Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. Gut. 2000; 46(3): 415-419. DOI: 10.1136/gut.46.3.415.
- Schosinsky KH, Lehmann P, Beeler M. Measurement of Ceruloplasmin from Its Oxidase Activity in Serum by Use of o-Dianisidine Dihydrochloride. Clinical Chemistry. 1974; 20(12): 1556-1563. PMID: 4214636.
- Carpio Meléndez P. Estudio de la Ceruloplasmina en sujetos de nuestro medio. An Fac med. 1968; 51(2): 56-67. ISSN: 1025-5583.
- Ravin M, Herbert A. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. The Journal of laboratory and clinical medicine. 1961; 58: 161-168. PMID: 13739892.
- Walshe JM, et al. Wilson's disease: the importance of measuring serum ceruloplasmin non-immunologically. Annals of clinical biochemistry. 2003; 40(2): 115-121. DOI: 10.1258/000456303763046021.
- Buffone GJ, Brett EM, Lewis SA, Losefsohn M. Limitations of immunochemical measurement of ceruloplasmin. Clinical chemistry. 1979; 25(5): 749-751. PMID: 436245.
- Pérez de Algaba I, Battikhi Vilar, B. Estadística básica aplicada al laboratorio clínico. Málaga: Ed Cont Lab Clín; 2016: p 71 – 76.
- Fernández SP, Díaz SP. Relación entre variables cuantitativas. En: Cad Aten Primaria Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. España: Coruña; 1997. P 141-144.
- Institute of Biochemistry and Bioinformatics at the Technical University. BRENDA [sede web]. Braunschweig: Technical University of Braunschweig; 1987 [actualizada Enero 2023; acceso Mayo 2022]. Disponible en: <https://brenda-enzymes.org/>.
- Catey, B. Correlation, agreement, and Bland-Altman analysis: statistical analysis of method comparison studies. American journal of ophthalmology. 2008; 148(1): 4-6. DOI: 10.1016/j.ajo.2008.09.032.
- Merle U, Eisenbach C, Weiss KH, Tuma S, Stremmel W. Serum ceruloplasmin oxidase activity is a sensitive and highly specific diagnostic marker for Wilson's disease. Journal of hepatology vol. 2009; 51(5): 925-930. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.06.022.
- Macintyre G, Gutfreund KS, Martin WR, Camicioli R, Cox DW. Value of an enzymatic assay for the determination of serum ceruloplasmin. The Journal of laboratory and clinical medicine. 2004; 144(6): 294-301. DOI: 10.1016/j.lab.2004.08.005



Esta obra está bajo la licencia Creative Commons Atribución-No Comercio. Compartir igual 4.0 Internacional. Permite compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato) y adaptar (remezclar, transformar y crear, a partir del material, otra obra) siempre que se cite la autoría y la fuente original de su publicación (revista, editorial y URL de la obra), no sean utilizados para fines comerciales y que se respeten los mismos términos de la licencia.