

Estudios para evaluar el hierro corporal

Studies for evaluation of body iron

ROQUE M, GATTI C, AGGIO M.

Laboratorio de Fisiología Humana. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. Argentina. San Juan 670 (8000) Bahía Blanca. Argentina. FAX: 54 291 4595130. mroque@uns.edu.ar.

Este trabajo fue realizado con el subsidio 24/B95 obtenido de la Secretaría General de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional del Sur. Argentina.

Correspondence and reprint requests should be addressed to Dr. Marta Roque. Fisiología Humana. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670. (8000) Bahía Blanca. Argentina. FAX: 291-4595.130. mroque@uns.edu.ar.

RESUMEN

Objetivos: Evaluar el estado del hierro del organismo mediante estudios multiparamétricos combinando el receptor de transferrina soluble (RTfs) con Ferritina, hemoglobina, saturación de transferrina (%). **Materiales y Métodos:** Adultos Sanos (AS)(n=51) y Anémicos Ferroprivos (AF)(n=50). RTfs y Ferritina se determinaron por ELISA. **Resultados:** El intervalo de confianza de la media del RTfs IC95(μ) fue 15.5-18.1 nmol/L con un 95% de probabilidad en AS. En el grupo AF el mv y rango del RTfs fueron 66.3 nmol/L y 16.1-148.4 nmol/L, (α) 0.05, respectivamente, y el índice RTfs/F fue mayor (75.8) que en AS (nivel de significación 5%). El estudio de la relación RTfs/Hb ($p < 0.001$), 71% (r^2) y Ferritina/Hb ($p < 0.001$), 70 % (r^2), mostró que para valores de Hb < 120 g/L, el RTfs es más sensible que la Ferritina. El índice RTfs/F ($p < 0,001$), 72% (r^2) mostró aumentos significativos para valores de Ferritinas $< 12\mu$ g/L. **Conclusiones:** Nuestros estudios confirman que el RTfs detecta con eficiencia diagnóstica cambios sensibles del hierro funcional. El uso combinado del RTfs con parámetros convencionales permite una rápida evaluación del estado del hierro.

PALABRAS CLAVES: Ferritina. Anemia ferropriva. Adultos sanos. Receptor de transferrina soluble.

ABSTRACT

Objective: Multi-parameter studies combining serum Transferrin Receptor (sTfR) with Ferritin, hemoglobin, transferrin saturation percentage for an assessment of iron status. **Materials and Methods.** Subjects: Healthy Adults (HA)(n=51) and Iron-Deficient Anemic Patients (IDAP) (n=50). sTfR and Ferritin were measured by ELISA. **Results:** Mean confidence interval IC95(μ) showed that the mean value for sTfR was 15.5-18.1 nmol/L (95% probability) in HA group. In IDAP both the sTfR mv and range (66.3 nmol/L, 16.1-148.4 nmol/L, (α) 0.05), and the sTfR/F Index (75.8) were greater than in HA (5% significance level). TfR/Hb ($p < 0.001$), 71% (r^2), and Ferritin/Hb ($p < 0.001$), 70 % (r^2), showed that for Hb < 120 g/L, sTfR is more sensitive than Ferritin. sTfR/Ferritin ($p < 0.001$), 72% (r^2) showed significant sTfR increases for ferritins $< 12\mu$ g/L. **Conclusion:** Our studies confirm that the sTfR detects iron-sensitive changes with a diagnostic accuracy. The combined use of sTfR and conventional parameters allows for easier iron status assessment.

KEY WORDS: Ferritin. Iron deficiency anemia. Healthy subjects. Soluble transferrin receptor.

INTRODUCCION

El diagnóstico clínico de las etapas de la deficiencia de hierro tuvo notables avances en las últimas décadas. Un aporte importante fue el descubrimiento del receptor de transferrina celular, su relación con la proteína transportadora transferrina, y la identificación de la fracción soluble, como marcador indirecto del hierro disponible para la eritropoyesis¹. Sin embargo, un problema crítico que se presenta en la práctica clínica es la confiabilidad de una prueba de laboratorio para diagnosticar o descartar la deficiencia de hierro.

La deficiencia de hierro asociada a distintas patologías es común en humanos y puede ser responsable de la disminución de las expectativas de vida². El desarrollo progresivo de la deficiencia de hierro presenta tres etapas bien definidas, y la anemia es evidente en la etapa final³. Uno de los problemas actuales que se presenta en la práctica clínica es determinar el estado de Fe del organismo. El criterio diagnóstico más usado se basa en una marcada disminución de la Ferritina sérica⁴ y una biopsia medular negativa⁵. Ambas pruebas tienen valor diagnóstico limitado: la concentración de Ferritina disminuye progresivamente a lo largo de la primera etapa de la deficiencia y no hay un criterio unánime sobre el valor de corte con valor diagnóstico preciso. Sus características de proteína de fase aguda hacen que su uso no sea aceptable como marcador de la deficiencia de hierro en las enfermedades inflamatorias⁶.

El receptor de transferrina celular es una molécula que une transferrina, la principal proteína de transporte de hierro a la membrana del eritroblasto¹. La forma soluble del RTf (RTfs) se identificó en suero humano⁷. El RTfs es un producto proteolítico del receptor de membrana que circula como un complejo de transferrina y su receptor⁸. Las concentraciones del RTfs son proporcionales a la expresión del RTf de membrana⁹ y se relacionan con el hierro total del organismo y con la actividad eritropoyética⁷.

Existen evidencias sobre aumentos del RTfs en hiperplasias eritroides, tanto efectivas (anemia hemolítica) como inefectivas (talasemia)¹⁰. Diversos autores mostraron que el RTfs es un marcador confiable de los estados severos de

INTRODUCTION

Accurate diagnosis of iron deficiency stages showed significant progress in the last decades. The discovery of cellular transferrin receptor, its relationship to the iron carrying protein transferrin, and the identification of the soluble fraction, as an indirect iron marker was an important contribution¹. A critical problem that usually occurs in clinical practice is the accuracy of a laboratory test to diagnose or rule out iron deficiency.

Iron deficiency associated diseases are common in humans and may be responsible for the reduction in life expectancy². The progressive development of iron deficiency occurs through three well-defined stages, and there is evident anemia only in the final stage³. One of the major clinical problems today is to determine iron status in the body. The commonly used criteria for iron deficiency diagnosis is based on a marked serum Ferritin decrease⁴ and a negative bone marrow biopsy⁵. Both tests are of limited diagnostic value: Ferritin concentration decreases progressively along the first stage of deficiency and there is not a unanimous criterion yet on the cut-off point for this protein with an acceptable diagnostic value. Its acute phase protein characteristics make its use complicated as a deficiency marker in inflammatory diseases⁶.

The cellular transferrin receptor (TfR) is a molecule that binds transferrin, the major blood iron carrier at the surface of the erythroblast¹. A soluble form of TfR (sTfR) has been identified in human serum⁷. sTfR is a truncated monomer of tissue receptor which circulates in the form of a complex of transferrin and its receptor⁸. Circulating concentrations of sTfR are proportional to cellular receptor expression of the membrane-associated TfR⁹ and is related to both body iron levels and erythropoietic activity⁷.

There is evidence of sTfR increases in erythroid hyperplasias, both effective (hemolytic anemia) and ineffective (thalassemia)¹⁰. Several authors showed that sTfR is a reliable marker for severe states of iron deficiency⁸. This receptor has some advantages over Ferritin since its plasmatic level is not affected by acute or chronic inflammatory illnesses^{11,12}. The aim of this work was to determine the diagnostic

deficiencia de hierro⁸. El RTfs presenta algunas ventajas sobre la Ferritina dado que su nivel plasmático no se modifica como respuesta a la inflamación aguda o crónica^{11,12}. El objetivo principal de este trabajo fue determinar el valor diagnóstico del RTfs mediante análisis estadísticos rigurosos, comparándolo con pruebas convencionales usadas en la práctica clínica.

MATERIALES Y METODOS

Grupos seleccionados: a) Adultos Sanos (AS) (n=51), hombres (n=18) y mujeres (n=33), rango de edad: 18-51 años (mujeres) y 22-70 años (hombres). Criterio de Inclusión: Hb>12g/dl (mujeres),>13g/dl (hombres); Saturación de Transferrina % (Sat. T%): >16% o <60%; Ferritina: >12 ng/ml (mujeres), >20ng/ml (hombres); leucocitos<11 x 10³/μl; eritrocitos<5.7x 10⁶/μl; Volumen Corpuscular Medio (VCM)>80fl o <100fl; reticulocitos <3%; b)Anémicos Ferroprivos (AF) (n=50), mujeres (n=28) y hombres (n=22), rango de edad: 18-49 años (mujeres) y 22-60 años (hombres). Criterio de Inclusión: Hb<12g/dl (mujeres) y <13g/dl (hombres); Ferritina <12ng/ml (mujeres pre-menopáusicas), <20ng/ml (hombres). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983. Se dispuso del consentimiento informado de todos los participantes.

Métodos Analíticos: El RTf soluble se determinó por inmunoanálisis enzimático (ELISA) (R&D System, Minneapolis). Ferritina sérica (F) por inmunoanálisis enzimático (ELISA). Hemograma, método automatizado usando CELL DYN 3500R Abbott y SEAC Genius. El hierro sérico y la capacidad total de fijación del hierro se midieron por métodos convencionales. La saturación de transferrina con hierro se calculó como la relación entre el hierro plasmático en μmol/L (multiplicado por 100) y la transferrina plasmática en g/L (multiplicado por 20). El material biológico fue suero y/o plasma, que fue conservado a -70°C hasta su uso.

value of sTfR by means of rigorous statistical analysis, comparing to conventional tests used in clinical practice.

MATERIALS AND METHODS

Selected Groups: a) Healthy Adults (HA) (n=51), males (n=18) and females (n=33), age range: 18 to 51 years (females) and 22-70 years (males). Inclusion Criterion: Hb>12g/dL (females),>13g/dL (males); Transferrin Saturation%(TSat.%):>16% or <60%; Ferritin: >12 ng/ml (females),>20ng/ml (males); leukocyte<11 x 10³/μl; erythrocytes<5.7x 10⁶/μl; Mean Corpuscular Volume (MCV)>80fl or <100fl; reticulocytes <3%; b)Iron-Deficient Anemic Patients (IDAP) (n=50), females (n=28) and males (n=22), age range: 18-49 years (females) and 22-60 years (males).The inclusion criterion: Hb<12g/dl (females) and <13g/dl (males);Ferritin <12ng/ml (pre-menopausal females), <20ng/ml (males). All procedures were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. All participants gave informed consent.

Analytical Methods: Soluble TRf was measured with a commercially available human transferrin receptor EIA kit (R&D Systems, Minneapolis). Serum ferritin was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Red cell data were obtained using a CELL DYN 3500 Abbott and SEAC Genius counter. Serum iron and total iron binding capacity were measured by standard methods. The transferrin iron saturation was calculated as the ratio of plasma iron in μmol/L (multiplied by 100) to plasma transferrin in g/L (multiplied by 20). The biological material used was serum and/or plasma, kept at -70°C until processing.

Statistical Analysis: Mean and standard deviation were calculated for each variable. Data were analyzed with the Kurtosis, Omnibus, and Skewness test (α=0.05). The relationships between sTfR, Ferritin and Hb were determined by linear regression analysis (confidence limit 95%). A p value of less than 0.05 was considered statistically significant. Student's t-test was used to evaluate the probability of any significant difference between

Estudios Estadísticos: Se calculó la media y el desvío estándar para cada variable. Los datos se analizaron con las pruebas de Kurtosis, Omnibus y Skewness ($\alpha=0.05$). La relación entre variables (RTfs, Ferritina, Hb) se determinó por análisis de regresión simple (nivel de confianza 95%). El valor de p estadísticamente significativo fue menor a 0.05. La probabilidad de diferencias significativas entre variables se evaluó por t-Student. El intervalo de referencia óptimo, la sensibilidad y la especificidad se calcularon por el análisis de las características del operador receptor (COR)¹³. La eficiencia diagnóstica del RTfs se determinó por el método de Statland(1987)¹⁴.

RESULTADOS

El perfil hematológico de los grupos AS y AF se muestra en la Tabla 1. El valor medio (vm) del RTfs fue 16.6 nmol/L, rango de referencia 8.8-26.2 nmol/L. No se observaron diferencias significativas por edad o sexo (t-Student, nivel de significación (α) 0.05). La distribución normal del RTfs fue evaluada por el Test de Lilliefors.

the variables tested. Diagnostic accuracy was determined by receptor-operator characteristic (ROC) curve analysis¹³. Diagnostic efficiency of sRfT was determined by Statland et al (1987)¹⁴.

RESULTS

The hematological profile of groups HA and IDAP is shown in Table 1. Mean value (mv) for sTfR was 16.6 nmol/L and reference range was 8.8-26.2 nmol/L. No significant differences were observed by age group or sex (t- Student, significance level (α) 0.05. sTfR normal distribution was confirmed by Lilliefors test.

TABLA 1: Parámetros Hematológicos en Adultos Sanos (n=51) y Anémicos Ferroprivos. Hb: hemoglobina; VCM: volumen corpuscular medio; Tf: transferrina; Tf Sat. %: saturación de transferrina %; RTfs: receptor de transferrina soluble. Los valores representan la media \pm 1DE.

TABLE 1: Hematology Parameters in Healthy Adults (n=51) and Iron-deficiency subjects. Hb: hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; Tf: transferrin; Tf Sat. %: transferrin saturation %; sTfR: soluble transferrin receptor. Values are mean \pm 1SD.

	Adultos Sanos Healthy Group		Anémicos ferroprivos Iron-deficiency Group
	MUJER WOMEN (n=33)	HOMBRE MEN (n=18)	MUJER WOMEN (n=28) HOMBRE MEN (n=22)
Hb (g/dl)	128.0 \pm 8.28 120-150	150.0 \pm 7.99 138-171	87.0 \pm 20.74 33-116
MCV (fl)	89.0 \pm 3.68 80-94	88.0 \pm 4.13 82.0-96.0	70.0 \pm 8.22 55-86
Iron (μ mol/L)	17.8 \pm 5.01 10.4-28.2	21.7 \pm 4.55 14.4-28.4	6.7 \pm 2.55 2.0-11.8
Tf (μ mol/L)	70.0 \pm 12.48 60.7-79.5	67.8 \pm 12.14 39.0-79.7	83.8 \pm 10.07 55.8-101.8
Tf (Sat %)	26.2 \pm 4.85 20.2-36.0	35 \pm 8.4 26.0-48.0	8.8 \pm 3.81 3.4-20.0
Ferritin(μ g/L)	50.9 \pm 37.07 15.4-161	148.6 \pm 83.02 65.5-353.3	8.9 \pm 3.17 3.0-12.0
sTfR (nmol/L)	16.5 \pm 4.20 8.9-24.4	17.3 \pm 4.29 9.5-26.2	65.7 \pm 33.63 16.1-159.8

En el grupo AS, la eficiencia diagnóstica del RTfs se analizó calculando los valores del vm y la media (medidas de centralización), y el rango, desviación estándar, percentilo y rangos intercuartílicos (medidas de dispersión). La distribución simétrica del RTfs se comprobó por el valor de aproximación del vm (16.8 nmol/L) y de la media (17.3 nmol/L). El intervalo de confianza de la media IC95(μ) mostró que el vm del RTfs se distribuye entre 15.5 y 18.1 nmol/L, con un 95% de probabilidad. El cálculo de los percentilos 2.5 y 97.5 tuvo un valor de 9.0 y 26.1 nmol/L, respectivamente. El rango intercuartílico calculado entre los percentilos 25 a 75 mostró que el 50% de los valores del RTfs estuvieron entre 12.9-20.2 nmol/L, confirmando su distribución alrededor de la media.

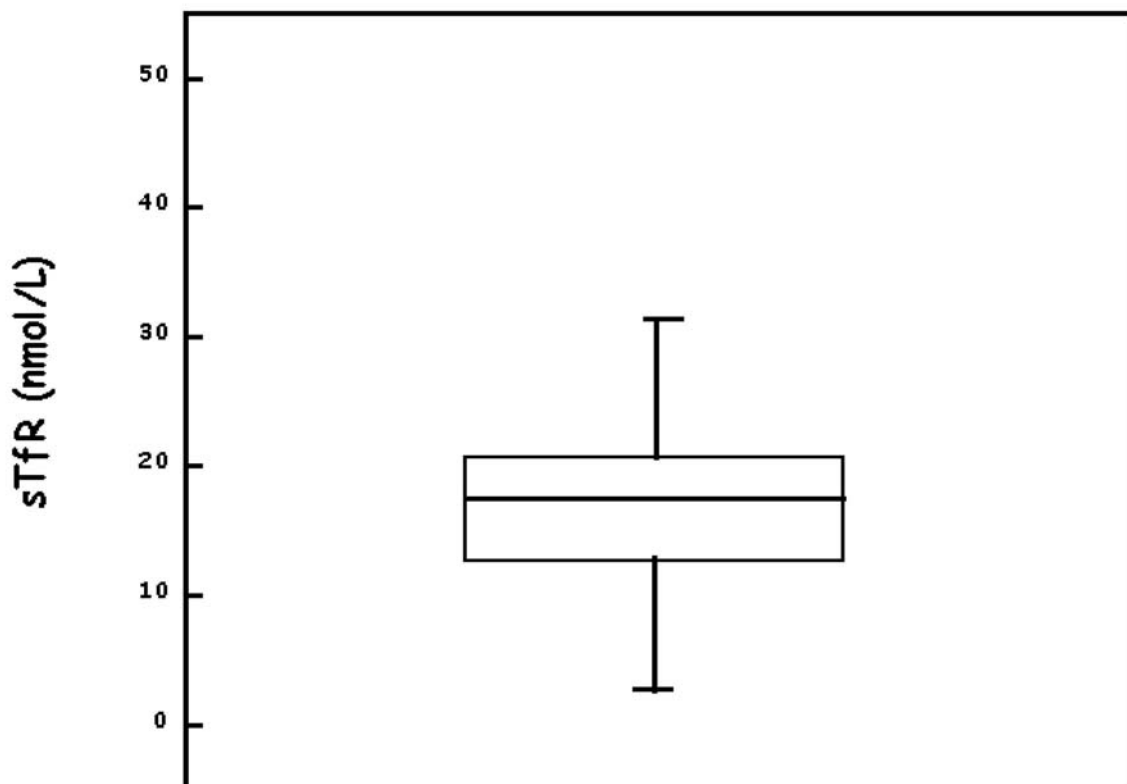
Diagnostic accuracy of sTfR was analyzed in HA by calculation of mv and median (centralization measures) and value range, standard deviation, percentile and interquartile ranges (spread measures). Mean value approximation (16.8 nmol/L) and median (17.3 nmol/L) showed the distribution symmetry of sTfR. Mean confidence interval IC95(μ) showed that the mv for sTfR was located between 15.5 and 18.1 nmol/L with a 95% probability. 2.5 and 97.5 percentile calculation determined a value of 9.0 and 26.1 nmol/L, respectively. The calculated interquartile range between percentiles 25 to 75 showed that 50% of sTfR values were between 12.9-20.2 nmol/L, thus confirming their distribution around the mean.

El modelo de Caja y Líneas informó que los datos no estaban alejados de la media. La Caja mostró que el 50 % de los datos estaban entre: a) borde inferior: determinado por el percentilo 25 (RTfs 12.9 nmol/L); b) borde superior: determinado por el percentilo 75 (RTfs 20.2 nmol/L). En las líneas, el 50% de los datos excluidos de la Caja, se incluyeron con la siguiente distribución: a) 25% línea inferior (RTfs entre 2.0-12.9 nmol/L); b) 25% línea superior (RTfs entre 20.2-31.1 nmol/L) (Figura 1).

The Box-and-Whisker plot visual model informed that there were no data far from the mean. The Box showed that 50% of the data was between: a) the lower border: determined by percentile 25 (sTfR 12.9 nmol/L); b) the upper border: determined by percentile 75 (sTfR 20.2 nmol/L). In the lines, 50% of the data excluded from the Box, were included with the following distribution: a) 25% lower line (sTfR between 2.0-12.9 nmol/L); b) 25% upper line (sTfR between 20.2-31.1 nmol/L) (Figure 1).

FIGURA 1. Modelo de Caja y Línea mostrando la distribución del RTfs en adultos sanos (n= 51). La línea horizontal representa el valor medio del RTfs. Los bordes superior e inferior de la caja indican los valores del RTfs para el 50% de la población. Las líneas, vertical superior e inferior, muestran el mayor y menor valor del RTfs, respectivamente, límites que contienen al 100% de la población estudiada.

FIGURE 1. Box and Whisker Plot showing sTfR distribution in healthy adults (n= 51). The horizontal bar represents the sTfR median. The upper and lower borders of the box mark sRfT values for 50% of the population. Vertical lines show the higher and lower sRfT value, limits containing 100% of population.



Luego de la validación diagnóstica del RTfs en los adultos sanos, sus niveles se determinaron en el grupo AF. Se observó que el 95% de los valores del RTfs fueron superiores a los obtenidos en el grupo AS: \bar{m} 66.3 nmol/L, rango 16.1-148.4 nmol/L (t-Student, nivel de significación (α) 0.05).

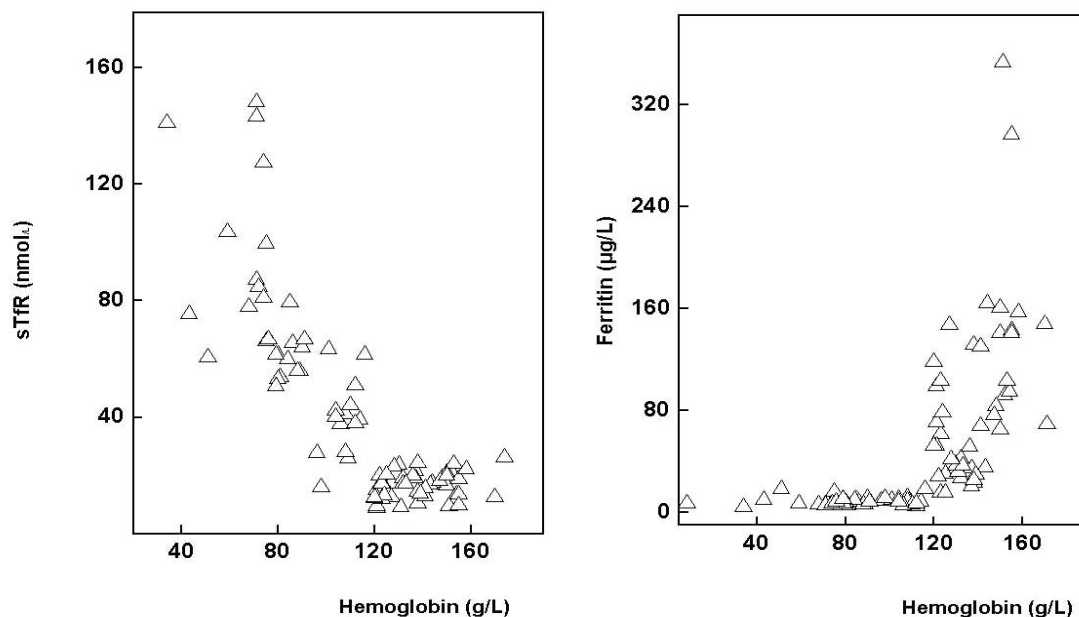
Las variables RTfs y Hb mostraron una ajustada relación inversa con tendencia exponencial ($p < 0.001$), $r^2 = 71\%$, indicando que la variación de Hb influye sobre el RTfs y que este efecto es más marcado para $Hb < 120$ g/L (Figura 2a).

As from sTfR diagnostic validation in HA, its levels were measured in IDAP. 95% of the sTfR values were higher than those of HA: \bar{m} 66.3 nmol/L, range 16.1-148.4 nmol/L (t-Student, significance level (α) 0.05).

The relationship between sTfR and Hb showed a tight inverse relationship with an exponential tendency ($p < 0.001$), $r^2 = 71\%$, indicating that Hb variation has an influence on sTfR and this effect is more noticeable for $Hb < 120$ g/L (Figure 2a).

FIGURA 2. Relación entre el Receptor de Transferrina soluble y Ferritina con Hemoglobina en adultos sanos ($n=51$) y anémicos ferroprivos ($n=50$). (a) El análisis de regresión muestra una relación inversa entre RTfs y Hb, con tendencia exponencial ($r^2=71\%$), $p < 0.001$. (b) El análisis de regresión muestra una relación inversa entre Ferritina y Hb con tendencia exponencial ($r^2=70\%$), $p < 0.001$. Los valores de las variables representan la media \pm 2DE de tres determinaciones.

FIGURE 2. Relationship between Soluble Transferrin Receptor and Ferritin with Hemoglobin in healthy adults ($n=51$) and iron-deficient patients ($n=50$). (a) The equation regression lines showed an inverse relationship of sTfR vs. Hb with exponential tendency ($r^2=71\%$), $p < 0.001$. (b) The equation regression lines showed and inverse relationship Ferritin vs. Hb with exponential tendency ($r^2=70\%$), $p < 0.001$. Values are mean \pm 2SD of three determinations.



Del análisis de la relación entre Ferritina y Hb se observó una tendencia exponencial entre ambas variables ($p < 0.001$) con un coeficiente de determinación del 70% (r^2). La distribución de datos de Ferritina no mostró cambios significativos para valores de $Hb < 120 \text{ g/L}$ (Figura 2b). El valor medio de Ferritina en el grupo AF fue $8.9 \pm 3.17 \text{ } \mu\text{g/L}$, rango de referencia 3.0-12.0 $\mu\text{g/L}$.

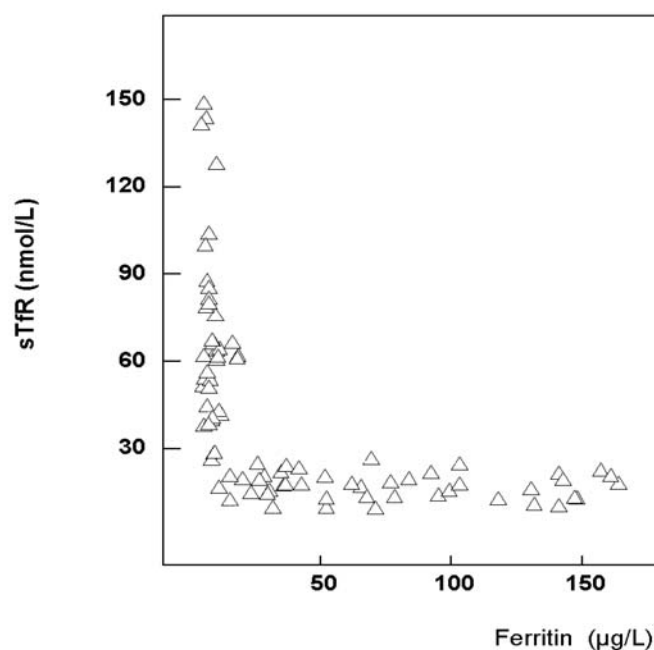
La relación entre RTfs y Ferritina en los grupos AS y AF mostró una ajustada relación inversa, con tendencia exponencial entre ambas variables ($p < 0.001$), coeficiente de determinación del 72% (r^2). El elevado valor de r^2 indicó que los cambios de Ferritina modifican sensiblemente al RTfs, observando un marcado incremento de este parámetro para valores de Ferritina $< 12 \mu\text{g/L}$ (Figura 3). La distribución del índice RTfs/F en AF tuvo un rango entre 15.7-200.4, con un vm (75.8) superior al observado en AS (9.6) (Wilcoxon, nivel de significación 5%).

When the correlation between Ferritin and Hb was studied, an exponential tendency relationship ($p < 0.001$) and a 70% (r^2) determination coefficient were observed. Ferritin data distribution showed insignificant changes for Hb values $< 120 \text{ g/L}$ (Figure 2b). Mean value for Ferritin in IDAP was $8.9 \pm 3.17 \text{ } \mu\text{g/L}$ and reference range was 3.0-12.0 $\mu\text{g/L}$.

The relationship between sTfR and Ferritin in HA and IDAP showed a tight inverse relationship, with exponential tendency among the variables ($p < 0.001$), 72% (r^2) determination coefficient. The high r^2 value indicated that Ferritin changes sensitively modify sTfR thus observing a marked increase for $< 12 \mu\text{g/L}$ Ferritin values (Figure 3). sTR/F index distribution in IDAP ranged between 15.7-200.4, with a mv (75.8) higher to that of HA (9.6) (Wilcoxon, 5% significance level).

FIGURA 3. Relación del Receptor de Transferrina soluble y Ferritina en adultos sanos ($n=51$) y en anémicos ferroprivos ($n=50$). Se muestra la relación inversa entre RTfs y Ferritina. El análisis de regresión de las variables determinó una tendencia exponencial con coeficiente de determinación ($r^2=72\%$), $p < 0.001$. Los valores de las variables representan la media \pm 2DE de tres determinaciones.

FIGURE 3. Relationship between Soluble Transferrin Receptor and Ferritin in healthy adults ($n=51$) and iron-deficient patients ($n=50$). The equation regression lines showed an inverse relationship of sTfR vs. Ferritin with exponential tendency ($r^2=72\%$), $p < 0.001$. Values are mean \pm 2SD of three determinations.

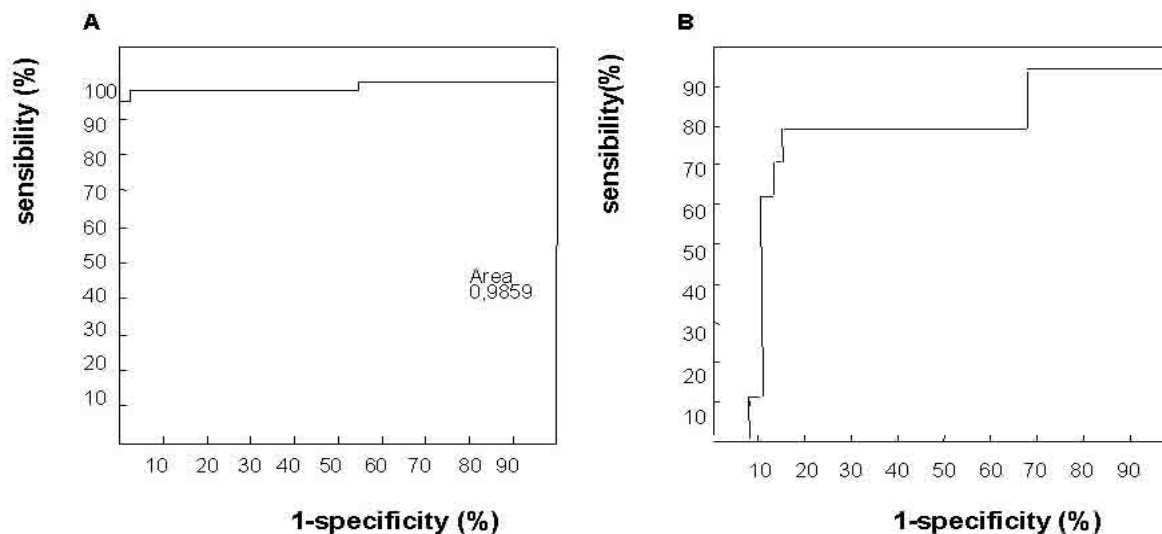


El cálculo de la sensibilidad (0.962) y especificidad (0.980) del RTfs en el grupo AS, determinadas por análisis COR, con Ferritina como "estándar de oro", mostraron: a) intervalo óptimo de referencia: 8.9-25.8 nmol/L; b) valores predictivos positivo y negativo: 97.5% y 97.7%, respectivamente; c) eficiencia diagnóstica: 97.7%. El uso de esta prueba aumentó la sensibilidad del RTfs en 2.5 % (Figura 4a).

Sensitivity (0.962) and specificity (0.980) calculation of sTfR in HA, assessed by ROC curve analysis, with Ferritin as the "gold standard" showed: a) optimum reference interval: 8.9-25.8 nmol/L; b) positive and negative predictive values: 97.5% and 97.7%, respectively; c) diagnostic efficiency: 97.7%. The use of this test increased sTfR sensitivity in 2.5 % (Figure 4a).

FIGURA 4. Curva de las Características Operativas del Receptor (COR) del RTfs y Ferritina. La población de referencia incluyó adultos sanos (n=51) y anémicos ferroprivos (n= 50). El área bajo la curva compara la eficiencia diagnóstica del RTfs (a) y de Ferritina (b). Se muestra la relación entre verdaderos positivos (sensibilidad) y falsos negativos (1-especificidad).

FIGURE 4. Diagnostic Accuracy Receiver-Operator Characteristic (ROC) Curves for sTfR and Ferritin. The reference population included healthy adults (n= 51) and iron-deficient anemic patients (n= 50). The area-under-the-curve was used to compare the diagnostic accuracy of sTfR (a) and Ferritin (b). The relationship between sTfR and Ferritin true positives (sensitivity) and false positives (1-specificity) is shown here.



El valor del corte óptimo de la Ferritina determinado por el análisis COR fue 25 g/L, con 95% y 91% de sensibilidad y especificidad, respectivamente (estándar de oro: RTfs, Tf Sat.%, VCM) (Figura 4b). El criterio usado para caracterizar individuos con deficiencia de Fe fue a- RTfs >28.1 nmol/L; b- Tf Sat.% <16%; c- VCM <80 fL.

El valor de corte óptimo para Tf Sat. %, calculado por análisis COR fue 20.5%, con 93% y 90% de sensibilidad y especificidad, respectivamente, siendo este valor de corte mayor que el citado por la literatura (16%) (estándar de oro: RTfs, Ferritina, VCM).

The optimum ferritin cut-off point analyzed by ROC curves was 25 g/L, with 95% and 91% sensitivity and specificity, respectively (gold standard: sTfR, Tf Sat.%, and MCV) (Figure 4b). The criterion used to characterize an iron-deficient individual was a- sTfR >28.1 nmol/L; b- Tf Sat.% <16%; c- MCV <80 fL.

The optimum cut-off point for T Sat % by ROC curve analysis was 20.5%, 93%, and 90% sensitivity and specificity, respectively (gold standard: sTfR, Ferritin, MCV), higher than the cut-off point quoted in the literature (16%).

DISCUSION

En presente trabajo, el RTfs fue evaluado como marcador del estado del hierro del organismo comparándolo con pruebas diagnósticas convencionales. Un aspecto destacable de nuestro estudio es la rigurosa validación estadística del RTfs como herramienta diagnóstica para evaluar estados de suficiencia y deficiencia de hierro. Se demostró que los niveles del RTfs en el grupo AF fueron superiores al valor de referencia del equipo comercial y que se distribuyeron dentro del rango de referencia establecido para la población de adultos sanos.

El análisis COR optimizó el límite superior del intervalo de referencia del RTfs aumentando su sensibilidad diagnóstica en 2.5%, con respecto al límite de referencia del equipo comercial usado en nuestro estudio. En el caso del RTfs, el área bajo la curva fue próxima a 1 (0.986), mientras que, para Ferritina estuvo más alejada de este valor. La sensibilidad y especificidad de la Ferritina revelaron una limitada capacidad para discriminar sujetos sanos de enfermos para niveles superiores a $12\mu\text{g/L}$ y no para valores inferiores a este punto de corte, donde es indiscutible el agotamiento de los depósitos de hierro. De las amplias variaciones del RTfs para concentraciones de Hb $<100\text{g/L}$ surge su ventaja potencial sobre la Ferritina, cuyos cambios fueron poco significativos para concentraciones de Hb $<120\text{g/L}$.

De nuestros estudios se puede concluir que el RTfs detecta con gran sensibilidad deficiencias severas de hierro, mientras que, la Ferritina informa en un rango de valores de Hb donde la eritropoyesis no esta afectada⁹.

La validación del RTfs fue útil para estimar que un alto porcentaje de sujetos fueron correctamente clasificados como ferroprivos puros (positivos verdaderos) y como no ferroprivos (negativos verdaderos).

Del uso del índice RTfs/Ferritina como herramienta diagnóstica surge que fue útil para discriminar las poblaciones AS y AF. Sin embargo, no aumentó la eficiencia diagnóstica del RTfs en el grupo AF. El valor de este índice como marcador surge de dos consideraciones; a) relaciona variables inversamente influenciadas por la actividad eritropoyética

DISCUSSION

In this work, sTfR was assessed as a marker of iron status in the body in comparison to other conventional diagnostic tests. One aspect that needs to be pointed out in our study is the strict statistical validation of sTfR as a diagnostic tool, in order to assess iron sufficiency and deficiency status. sTfR levels in IDAP were shown to be higher than those of the commercial kit reference value and were distributed within the reference range established for healthy adult population. ROC curve analysis optimized the sTfR reference interval upper limit thus increasing diagnostic sensitivity in 2.5% with regard to the reference limit indicated by the commercial kit used in our study. In the case of sTfR, the area-under-the-curve (AUC) was close to 1 (0.986), while the AUC observed for Ferritin was far away from this value. Ferritin sensitivity and specificity showed a limited capacity to discriminate healthy from diseased individuals for levels higher than $12\mu\text{g/L}$ and not for values lower than this cut-off point, in which iron deposit depletion is already evident. From wide sTfR variations for Hb $<100\text{g/L}$ concentrations, it arises its potential advantage over Ferritin, the changes of which were insignificant Hb $<120\text{g/L}$ concentrations. From our studies, we can reach to the conclusion that sTfR detects severe iron deficiencies with great sensitivity, while Ferritin reports in an Hb value range those cases in which erythropoiesis was not affected⁹. sTfR validation was useful in order to estimate that a high percentage of individuals were correctly classified as pure iron-deficient (true positives) and as non-iron-deficient (true negatives) patients.

The use of the sTfR/Ferritin index arises its diagnostic usefulness in order to discriminate HA and IDAP populations. However, in IDAP the diagnostic efficiency did not improve with regard to sTfR. Two considerations would highlight the value of this index as a marker; a) it relates to variables inversely influenced by medullar erythropoietic activity, iron deposit, and erythropoiesis-available iron; b) it could have important physiopathological connotations when relating the production and reserve compartments.

medular, el hierro de depósito y el disponible para la eritropoyesis; b) su uso podría tener connotaciones fisiopatológicas importantes al relacionar el compartimiento productor con el de reserva.

Nuestros estudios confirman que el RTfs detecta cambios sensibles de hierro con precisión diagnóstica. El uso combinado de RTfs con parámetros convencionales facilita la evaluación del estado del hierro. En la anemia manifiesta se debe enfatizar la importancia diagnóstica del RTfs respecto a la Ferritina. Cuando se evalúa la Ferritina en anémicos su sensibilidad es escasa para valores ≤ 12 g/L¹⁵. Nuestras observaciones son apoyadas por dos características bien establecidas: la concentración del RTfs refleja la avidéz de hierro de las células eritroides⁸ y el tamaño del compartimiento progenitor eritropoyético¹⁶.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Marisa Sandoval por su experta asistencia técnica.

Our studies confirm that the sTfR detects iron-sensitive changes with a diagnostic accuracy. The combined use of sTfR and conventional parameters allows for easier iron status assessment. In evident anemia, the diagnostic importance of sTfR with regard to Ferritin should be emphasized. When Ferritin is examined in anemic populations, its sensitivity is poor when a diagnostic value is ≤ 12 g/L¹⁵. Our observations are supported by two well-established characteristics: sTfR concentration shows iron avidity in erythroid cells⁸ and in the size of the erythropoietic progenitor compartment¹⁶.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Marisa Sandoval for her expert technical assistance.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Ponka P, Lok CN . The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1111-37.
2. Andrews N. Iron Metabolism: Iron Deficiency and Iron Overload. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:75-98.
3. Cook JD, Skikne BS. Iron deficiency: definition and diagnosis. *J Intern Med* 1989;226:349-55.
4. Cooper MJ, Zlotkin SH. Day-to-day variation of transferrin receptor and Ferritin in healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 1996;64:738-42.
5. Lundin P. Comparison of hemosiderin estimation in bone marrow smears. *Acta Med Scand* 1964;175:384-9.
6. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1275:161-203.
7. Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, Einspahr D, Finch CA. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 1990;75:102-7.
8. Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 1990;75:1870-6.
9. Baynes RD, Skikne BS, Cook JD. Circulating transferrin receptors and assessment of iron status. *J Nutr Biochem* 1994;5:322-30.
10. Camaschella C, Gonella S, Calabrese R, Vischis F, Roetto A, Graziadei G, Mazza U, Cappellini M. Serum erythropoietin and circulating transferrin receptor in thalassaemia intermedia patients with heterogeneous genotypes. *Haematologica* 1996;81:397-403.
11. Ferguson BJ, Skikne BS, Simpson KM, Baynes RD, Cook JD. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from deficiency anemia. *J Lab Clin Med* 1992;19:385-90.
12. Junca J, Fernandez-Aviles F, Oriol A, Navarro JT, Milla F, Sancho JM, Feliu E. The usefulness of the serum transferrin receptor in detecting iron deficiency in the anemia of chronic disorders. *Haematologica* 1998; 83:676-80.
13. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristics (ROC) plots A fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;36: 561-77.
14. Statland BE, Winkel P. Utilization review and management of laboratory testing in the ambulatory setting. *The Medical Clinics of North America*, editor WB Saunders 1987;719-32.
15. Mast AE, Blinder MA, Gronowski AM, Chumley C, Scott M. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. *Clin Chem* 1998;44:45-51.
16. Beguin Y, Clemons K, Pootrakul P, Fillet G . Quantitative assessment of erythropoiesis and functional classification of anemia based on measurements of serum transferrin receptor and erythropoietin. *Blood* 1993;81:1067-76.