



TECO GRAM S.A.
Av. San Jorge 428 y 10ma.
Guayaquil - Ecuador
042396966 – 042397979 – 042396610
tecogram@gye.satnet.net

JUEGO DE REACTIVOS DE FÓSFORO INORGÁNICO (METODO UV)

USO DIRIGIDO

El reactivo del fósforo inorgánico (método UV) es para la determinación cuantitativa del fósforo inorgánico en suero humano.

INTRODUCCION

La mayoría del fósforo del cuerpo se encuentra en los huesos como hidroxapatita. El fósforo restante está presente como fosfato inorgánico y ésteres de fosfato. El fósforo actúa en el metabolismo intermediario de carbohidratos y es un componente de otras sustancias fisiológicamente importantes. Así, puede existir un aumento del fósforo en el suero en los casos de hipervitaminosis, hipoparatiroidismo, y problemas renales. Existen niveles reducidos de fósforo en los sueros de pacientes con raquitismo (deficiencia de la vitamina D), hiperparatiroidismo, y síndrome de Fanconi.

La determinación de fósforo inorgánico ha sido basada en la reacción del molibdato con fosfato para producir el complejo azul de fosfomolibdato, el cual se mide fotométricamente. De cualquier forma, muchos de los componentes en estos reactivos son inestables y han tenido que ser almacenados separadamente. El complejo no reducido de fosfomolibdato se mide directamente en un rango UV a 340 nm en el método presente.

PRINCIPIO

Fósforo inorgánico + H₂SO₄ + Molibdato de amonio
----- > Complejo no reducido de fosfomolibdato.

El fósforo inorgánico reacciona con el molibdato de amonio en un medio ácido para formar el complejo de fosfomolibdato, el cual absorbe la luz a 340 nm. La absorbancia a esta longitud de onda es directamente proporcional a la cantidad de fósforo inorgánico presente en la muestra.

REACTIVOS

Reactivo de Fósforo inorgánico: Molibdato de amonio 0.4 mM. Acido sulfúrico 210 mM con surfactante.

PRECAUCIONES

1. Los reactivos son únicamente para uso diagnóstico "In Vitro".

2. No pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos con la piel, ojos y ropa.

PREPARACION DEL REACTIVO

El reactivo viene de una forma lista para usarse.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

Almacene el reactivo y el estándar a temperatura de refrigeración (2 – 8°C).

DETERIORO DEL REACTIVO

- No use si:
1. El reactivo sin haber añadido el suero tiene una absorbancia mayor de 0.500 a 340 nm.
 2. El reactivo falla al recobrar los valores establecidos para el control.

RECOLECCION DE LA MUESTRA Y ALMACENAMIENTO

1. Use solo el suero claro y no hemolizado que ha sido separado de los eritrocitos tan pronto como haya sido posible. Los eritrocitos contienen fosfato orgánico que puede hidrolizarse cuando se deja reposar o puede adherirse enzimáticamente por los fosfatos. El fosfato inorgánico puede entonces filtrarse a través de las paredes de las células, aumentando la concentración.
2. Una vez que el suero ha sido separado, el contenido del fósforo o cambiará por al menos una semana cuando ha sido guardado bajo refrigeración (2 – 8°C).

INTERFERENCIAS

Para una lista comprensiva de sustancias que interfieren con la Medición de Fósforo Orgánico vea Young, et al.

MATERIALES PROVISTOS

1. Reactivo de Fósforo Inorgánico.
2. Estándar de Fósforo Inorgánico.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Pipetas de precisión.
2. Tubos de ensayo/gradillas.
3. Cronómetro.
4. Espectrofotómetro con capacidad de leer a 340 nm.

PROCEDIMIENTO (AUTOMATIZADO)

Vea las instrucciones apropiadas de aplicación del instrumento.

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

1. Rotule los tubos de ensayo de la siguiente forma: Blanco, Estándar, Control, Paciente, etc.
2. Pipetee 1.0 ml del reactivo en cada tubo. Deje que lleguen a temperatura ambiente (25°C).
3. Añada 0.02 ml (20 µl) de muestra a los tubos respectivos, mezcle, y permita que repose por cinco (5) minutos a temperatura ambiente.
4. Ponga el espectrofotómetro a cero con agua destilada a 340 nm.
5. Lea y anote las absorbancias de todos los tubos.
*SE PUEDE USAR EL CALIBRADOR TC-MULTIPROPÓSITO PARA REMPLAZAR AL ESTÁNDAR.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

1. Para espectrofotómetros que requieren una mayor cantidad de volumen total para lecturas precisas, se puede usar una ración de 3.0 ml de reactivo para 0.1 ml (100 µl)
2. Las muestras lipémicas o ictericas requieren de un suero “blanco”. Para mayor precisión se debe correr un suero “blanco” en cada muestra.
 - a. Añada muestra a la solución salina.
 - b. Ponga el espectrofotómetro a cero a 340 nm con solución salina.
 - c. Lea y anote las absorbancias de los blancos de suero.
 - d. Reste las absorbancias de las absorbancias de la prueba.

CALCULOS

Abs.= Absorbancia

$\frac{\text{Abs. desconocida} - \text{Absorbancia del reactivo blanco}}{\text{Conc. de Estd.}}$

Abs. del estándar – Abs. del reactivo blanco (mg/dl)

= Fósforo inorgánico

Ejemplo:

Abs. de reactivo blanco = 0.536

Abs. desconocida = 0.918

Abs. de estándar = 1.012

Conc. d estándar = 5 mg/dl.

$$\frac{0.918 - 0.536}{1.012 - 0.536} \times 5 = \frac{0.382}{0.476} = 4.0$$

Para obtener resultados en unidades SI (mmol/L), multiplique el resultado en mg/dl por el factor 0.323

Ejemplo: 4.0 mg/dl = 1.296 mmol/L

LIMITES

El detergente más comúnmente utilizado y los paños húmedos desechables usados en los laboratorios contienen fosfatos, y el uso de material de vidriería lavado inapropiadamente puede provocar valores elevados del fósforo inorgánico.

CALIBRACION

No es necesario determinar la curva del estándar puesto que la reacción es lineal en un rango de hasta 12 mg/dl. De todas formas, se debe usar un reactivo de blanco y estándar con cada juego de muestras analizadas.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda que se incluyan controles en cada juego de ensayos. Se puede usar rutinariamente material de control comercialmente disponible para el control de calidad. El valor asignado del material de control debe ser confirmado por la aplicación escogida. El fracaso al obtener un rango apropiado de valores en el ensayo del material de control puede indicar el deterioro del reactivo, mal funcionamiento del instrumento o errores en el procedimiento.

VALORES ESPERADOS

Adultos: 2.5 – 4.8 mg/dl.

Este rango debe servir solo como una guía. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores esperados puesto que existen diferencias entre lo instrumentos, laboratorios y la población local.

FUNCIONAMIENTO

1. Linearidad: 12 mg/dl.
2. Sensibilidad: Basada en una resolución de instrumento de A – 0.001, el procedimiento presente tiene una sensibilidad de 0.01 mg/dl.
3. Comparación: Un estudio de comparación realizado entre este método y uno basado en la misma metodología condujo a un coeficiente de correlación de 0.99 con una ecuación de regresión de $y = 1.01x - 0.06$.
4. Precisión:

Precisión día a día: Se analizaron dos sueros de control comerciales por un período de treinta (30) días y se obtuvo la siguiente precisión día a día:

Día a día (N = 21)		
Promedio (mg/dl)	S.D.	C.V.(%)
3.2	0.2	6.6
7.2	0.3	4.1

Precisión dentro de la corrida: Dos sueros de control comerciales fueron analizados (20) veces y se obtuvo la siguiente precisión dentro de la corrida:

Dentro de la corrida (N = 21)		
<u>Promedio</u> (mg/dl)	<u>S.D.</u>	<u>C.V.(%)</u>
3.0	92	7.7
7.4	0.5	6.7