



Fosfatemia

Método para la determinación de fósforo inorgánico y fosfolípidos

• DETERMINACION DE FOSFORO INORGANICO SIGNIFICACION CLINICA

El fósforo se encuentra en el organismo formando parte de compuestos orgánicos (proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc.) o como fosfatos inorgánicos, cumpliendo diversas funciones (transporte de energía, estructura de los tejidos, mantenimiento del pH de los líquidos corporales).

Es constituyente esencial de los tejidos óseo y muscular y participa en la composición del tejido nervioso.

Su concentración en circulación está regulada entre otros factores por los niveles de vitamina D y las glándulas endocrinas, observándose variaciones fisiológicas de acuerdo a la edad, ingesta, actividad física, embarazo, etc.

Existen situaciones patológicas en las que se altera este equilibrio, produciéndose anomalías en la concentración de fósforo circulante. Niveles elevados de fósforo sérico son encontrados en el hipoparatiroidismo, mientras que el hiperparatiroidismo conduce a la situación contraria. También puede encontrarse hiperfosfatemia por hipervitaminosis D y diversos trastornos renales, mientras que la hipofosfatemia se relaciona con deficiencias de vitamina D y defectos en la reabsorción de fósforo a nivel renal.

FUNDAMENTOS DEL METODO

El fosfato inorgánico reacciona en medio ácido con el molibdato para dar fosfomolibdato, que es reducido por el ácido ascórbico a azul de molibdeno, desarrollándose el color en medio arsenito/citrato. El arsenito/citrato se combina con el exceso de molibdato impidiendo su reacción posterior con el fosfato liberado de los ésteres lábiles. El color obtenido se mide entre 620 y 650 nm.

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución de molibdato de sodio 230 mmol/l en ácido clorhídrico 1 mol/l.

B. Reactivo B: ácido ascórbico ($\geq 5,6$ mmol) desecado.

C. Reactivo C: solución de arsenito de sodio 120 mmol/l en citrato de sodio 50 mmol/l con agentes tensioactivos.

S. Standard: solución estabilizada de fosfatos que equivale a 4 mg/dl de fósforo inorgánico.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo A: listo para usar.

Reactivo B: disolver añadiendo 80 ml de agua destilada. Se obtiene una solución con concentración ≥ 70 mmol/l.

Reactivo C: listo para usar. A baja temperatura los componentes del reactivo pueden precipitar. En tal caso, colocar en baño de agua a 37°C unos minutos, mezclando luego por inversión.

Standard: listo para usar.

PRECAUCIONES

Los Reactivos Provistos son para uso diagnóstico "in vitro".

Reactivo A: corrosivo. H315 + H320: Provoca irritación cutánea y ocular. H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

Reactivo C: nocivo. H302 + H332: Nocivo en caso de ingestión o inhalación. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables a temperatura ambiente hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Reactivo B: es estable un año en refrigerador (2-10°C) a partir del momento de su preparación.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Valores de Blanco superiores a 0,050 D.O. indican contaminación de los reactivos. En tal caso deben desecharse. La solución de ácido ascórbico del Reactivo B puede oxidarse y tornarse amarillenta por contaminantes químicos presentes en el agua destilada, disminuyendo o incluso eliminando la respuesta cromogénica. En este caso puede reemplazarse por una solución de ácido ascórbico p.a. 70 mmol/l, preparada extemporáneamente.

MUESTRA

Suero, plasma u orina

a) Recolección: se debe obtener suero o plasma de la

manera usual. También puede realizarse la determinación en orina. En este caso, recoger orina de 24 horas en un recipiente que contenga 2 ml de CIH concentrado, y diluir a 2 litros con agua. Tomar una alícuota y efectuar una dilución 1:5 en agua destilada. Proceder en la misma forma que la descrita en PROCEDIMIENTO.

b) Aditivos: en caso de que la muestra a utilizar sea plasma, se recomienda el uso de **Anticoagulante W** de Wiener lab. para su obtención.

c) Sustancias interferentes conocidas: el oxalato interfiere en la determinación.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el suero o plasma debe ser separado de los glóbulos rojos dentro de las 2 horas de extraído y la determinación efectuada inmediatamente; de lo contrario se deberá refrigerar la muestra para evitar el aumento de fósforo inorgánico producido por hidrólisis enzimática de los ésteres orgánicos lábiles. La orina es estable 7 días refrigerada (2-10°C).

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro
- Micropipetas y pipetas
- Probeta y tubos
- Baño de agua a 37°C
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 620-650 nm en espectrofotómetro o 620-700 nm en fotocolorímetro con filtro rojo.
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 12 minutos
- Volumen de muestra: 20 ul
- Volumen final de reacción: 3,52 ml

PROCEDIMIENTO

En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) colocados en baño de agua a 37°C, agregar:

	B	S	D
Standard	-	20 ul	-
Muestra	-	-	20 ul
Reactivo A	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar por agitación suave. Esperar por lo menos 30 segundos y no más de 2 minutos. Luego agregar:

Reactivo B	1 ml	1 ml	1 ml
-------------------	------	------	------

Mezclar. Esperar por lo menos 30 segundos y no más de 2 minutos. Luego agregar:

Reactivo C	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
-------------------	--------	--------	--------

Mezclar por inversión. A los 10 minutos retirar del baño y leer en espectrofotómetro entre 620 y 650 nm o en fotocolorímetro con filtro rojo (620-700 nm), llevando el aparato a cero con el Blanco.

Nota: al agregar Reactivo A se produce turbiedad por precipitación proteica. Los agentes tensioactivos del Reactivo C provocan su redisolución total, obteniéndose una solución perfectamente límpida.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción final es estable 3 horas por lo que la absorbancia debe ser leída en ese lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Suero o plasma

$$Pi \text{ (mg/dl)} = \frac{D}{S} \times 4 \text{ mg/dl}$$

El valor del Standard es reproducible pero se aconseja repetirlo con cada lote de determinaciones.

Orina

$$Pi \text{ (g/24 hs)} = \frac{D}{S} \times 0,4 \text{ g/24 hs}$$

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Si la muestra a ensayar es suero o plasma, procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de fósforo, con cada determinación. En el caso de muestras de orina, utilizar un control con base de orina.

VALORES DE REFERENCIA

Suero

Adultos: 2,50 a 4,50 mg/dl

Niños: 4,00 a 6,50 mg/dl

Orina

0,34 a 1,00 g/24 horas

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CONVERSION DE UNIDADES AL SISTEMA SI

$$Pi \text{ (mg/dl)} \times 0,323 = Pi \text{ (mmol/l)}$$

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.
- Contaminación con fosfatos: todo el material de vidrio usado (incluso en la recolección de la muestra) debe estar libre de fosfatos. Para su limpieza se recomienda usar Noion de Wiener lab. Blancos elevados indican contaminación; si los valores son superiores a 0,050 D.O., los reactivos deben desecharse.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando replicados de las mismas muestras se obtuvieron los siguientes datos:

Nivel	D.V.	C.V.
2,00 mg/dl	± 0,033 mg/dl	1,6 %
8,00 mg/dl	± 0,043 mg/dl	0,5 %

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de fosfato inorgánico a distintas muestras se obtuvo una recuperación entre 97,2 y 102,4% en el caso de suero y 98,9 y 102,5% para orina.

c) Linealidad: la reacción es lineal hasta 16 mg/dl.

• DETERMINACION DE FOSFOLIPIDOS

SIGNIFICACION CLINICA

Los fosfolípidos son biomoléculas lipídicas, que contienen fosfatos en su composición. Son componentes principales de las membranas celulares y de las lipoproteínas circulantes.

La concentración de fosfolípidos séricos está sujeta a variaciones fisiológicas debidas a cambios en la dieta, edad y condiciones especiales como embarazo, ciclo menstrual, etc. Las variaciones patológicas muy frecuentemente están asociadas a cambios en las demás fracciones lipídicas. Este hecho se manifiesta por ejemplo en afecciones como diabetes mellitus, aterosclerosis, alcoholismo agudo, síndrome nefrótico, etc., que cursan habitualmente con hiperlipemia, y en las que se observa un aumento anormal de los niveles de fosfolípidos. Esta situación ha hecho que se le preste especial atención a las relaciones entre colesterol y fosfolípidos en diversas condiciones.

También es posible encontrar niveles anormalmente bajos de fosfolípidos, estando éstos relacionados generalmente con una nutrición deficiente o síndrome de malabsorción.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Los fosfolípidos son extraídos específicamente del suero con mezcla de Bloor. Una alícuota del extracto es evaporada a sequedad y mineralizada por calcinación.

En el residuo se determina cuantitativamente el fósforo inorgánico mediante la reacción colorimétrica de **Fosfatemia**.

REACTIVOS PROVISTOS

Reactivos de **Fosfatemia** Wiener lab.

REACTIVOS NO PROVISTOS

- Etanol puro 96°.

- Eter etílico calidad analítica o anestésica.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivos Provistos: ver determinación de fosfatemia.

Mezcla Extractante: preparar mezclando 3 partes de etanol puro 96° y una parte de éter etílico.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: obtener la muestra con 12-14 horas de ayuno.

b) Aditivos: en caso de que la muestra a utilizar sea plasma, se recomienda el uso de Anticoagulante W de Wiener lab.

c) Sustancias interferentes conocidas: ver determinación de fosfatemia.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: ver determinación de fosfatemia.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

Ver determinación de fosfatemia.

- Probeta para preparar la Mezcla Extractante.

- Tubos de Kahn.

CONDICIONES DE REACCION

Ver determinación de fosfatemia.

PROCEDIMIENTO

En un tubo de Kahn colocar 100 ul de suero y agregar 4 ml de Mezcla Extractante. Tapar y agitar vigorosamente de medio a un minuto. Centrifugar 3 minutos a 3.000 rpm. Tomar 1 ml del sobrenadante límpido y colocar en un tubo de ensayo o de fotocolorímetro. Llevar a Baño María hirviendo eléctrico (vapores inflamables) evaporando hasta sequedad. Retirar del baño cuando no haya más restos de solvente. Como los vapores suelen condensarse en la zona superior del tubo, completar la evaporación soplando la boca del tubo o prolongando el calentamiento.

Mineralización: se logra por simple calcinación del extracto seco, observando las siguientes precauciones: a) usar una llama suave del mechero de gas o alcohol y b) tomar el tubo por la boca y rotándolo lentamente calentar todo el fondo y parte de la pared que contenga extracto. Primero se observa ennegrecimiento del material con desprendimiento de vapores blancos. Se sigue calentando con mayor intensidad hasta que todo el residuo haya blanqueado. Si queda algún punto negro se intensifica el calentamiento en esa zona.

Preparar 3 tubos: B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido, residuo mineralizado) y colocar en baño de agua a 37°C. Utilizar 50 ul de Standard y agregar los reactivos de **Fosfatemia** (2 ml de Reactivo A, 2 ml de Reactivo B y 3 ml de Reactivo C como se indica en el Procedimiento para fosfatemia).

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

Ver determinación de fosfatemia.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{Fosfolípidos (g/l)} = \text{factor} \times D \quad \text{factor} = \frac{2,25}{S}$$

$$\text{El factor 2,25 surge de: } 0,04 \times \frac{50}{100} \times 4,5 \times 25 = 2,25$$

donde:

0,04 = g/l de Pi en el Standard

50 ul = volumen del Standard

100 ul = volumen de muestra

4,5 = dilución de la muestra

25 = factor de conversión de P inorgánico en fosfolípidos.

La reacción colorimétrica sigue la ley de Beer hasta 8 g/l de fosfolípidos. Para valores superiores debe repetirse la determinación empleando menor cantidad del extracto de etanol-éter.

VALORES DE REFERENCIA

1,0 a 3,0 g/l.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver determinación de fosfatemia.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando replicados de las mismas muestras se obtuvieron los siguientes datos:

Nivel	D.S.	C.V.
3 g/l	± 0,093 g/l	3,1 %
7,5 g/l	± 0,180 g/l	2,4 %

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de fosfolípidos a distintas muestras se obtuvo una recuperación entre 96,8 y 103,2%.

PRESENTACION


- 80 determinaciones (Cód. 1382001).

BIBLIOGRAFIA

- Vanderlinde, R. & Kowalski, P. - Clin. Biochem. 4:76 (1971).
- Martinek, R.C. - J. Am. Med. Technol. 32:337 (1970).
- Baginski E.S.; Foa, P.P. & Zak. B. - Clin. Chem. 13/4:326 (1967).
- Baginski E.S.; et al. - Am. J. Med. Technol. 35:475 (1969).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

SIMBOLOS

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Uso diagnóstico "in vitro"

 Contenido suficiente para <n> ensayos

 Fecha de caducidad

 Límite de temperatura (conservar a)

 No congelar

 Riesgo biológico

 Volumen después de la reconstitución

 Contenido

 Número de lote

 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Cáustico

 Irritante

 Consultar instrucciones de uso


 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Disp. N°: 252/75 - 5661/99



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina