

FÓSFORO



Fósforo. Fosfomolibdato. UV Determinación cuantitativa de fósforo Solo para uso in vitro en el laboratorio clínico Conservar a 2-8°C	Ref.: PHO-012 2 x 125 mL CAL: 1 x 5 mL
--	--

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Método directo para la determinación de fósforo inorgánico.
El fósforo inorgánico reacciona en medio ácido con molibdato amónico formando un complejo fosfomolibdico de color amarillo.
La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de fósforo inorgánico presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

El fósforo, es esencial para la formación del tejido óseo y el metabolismo energético celular. Aproximadamente un 85% se encuentra en el hueso y en los dientes.
Niveles bajos de fósforo pueden ser debidos a hipervitaminosis D, hipertiroidismo primario, desordenes renales, ingestión de antiácidos o mala absorción.
Niveles altos son atribuidos a la dieta, metástasis de huesos, alteraciones en el hígado, alcoholismo, diarreas y vómitos^{1,5,6}.
El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R	Molibdato amónico	0,40 mM
Molibdico	Ácido sulfúrico (SO ₄ H ₂) Detergente	210 mM
PHOSPHORUS CAL	Patrón primario acuoso de Fósforo 5 mg/dL	

PRECAUCIONES

R: H314-Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto.

PREPARACIÓN

Reactivo y Patrón listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

PHOSPHORUS CAL

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 340 nm $\geq$ 0,54.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro ó analizador para lecturas a 340 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio^[Nota 1,2].

MUESTRAS

- Suero o plasma¹⁻⁵:
Libre de hemólisis. El suero o plasma deben separarse lo antes posible de los eritrocitos con el fin de evitar la liberación de fósforo de los hematíes. Estabilidad: 7 días a 2-8°C.

- Orina^{1,2} (24 h):
Recoger la orina en recipientes conteniendo 10 mL de ácido clorhídrico (ClH) al 10% (v/v) para evitar la precipitación de fosfatos. Ajustar pH 2.
Diluir la muestra 1/10 con agua destilada. Mezclar. Multiplicar el resultado por 10 (factor de dilución). Estabilidad: 10 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 340 nm
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C / 30°C / 25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta^[Nota 4]:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ^[Nota 1,3] (μL)	--	10	--
Muestra (μL)	--	--	10

- Mezclar e incubar 5 minutos.
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo.

CÁLCULOS

Suero: $\frac{(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco}}{(A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Blanco}} \times 5$ (Conc. Patrón) = mg/dL de fósforo en

la muestra

Orina 24 h: $\frac{(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco}}{(A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Blanco}} \times 5 \times \text{vol. (dL) orina/24h}$ = mg/24 h

de fósforo

Factor de conversión: mg/dL x 0,323= mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados.
Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.
Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

Suero o plasma:		
Niños	4,0 – 7,0 mg/dL	$\cong$ 1,29 – 2,26 mmol/L
Adultos	2,5 – 5,0 mg/dL	$\cong$ 0,80 – 1,61 mmol/L
Orina:		
Adultos	0,4 – 1,3 g / 24 h	

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el *límite de detección* de 0,000 mg/dL hasta el *límite de linealidad* de 35 mg/dL.
Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n= 20)	Interserie (n= 20)
Media (mg/dL)	4,09	7,12
SD	0,03	0,046
CV (%)	0,62	0,80

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0798 A.

Exactitud: Los reactivos de BSM (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).
El ensayo con 50 muestras dio los siguientes resultados:
Coeficiente de correlación (r)²: 0,8577.
Ecuación de la recta de regresión: y= 0,724x + 0,837.
Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No realizar la prueba con muestras hemolizadas ya que los hematíes contiene una alta concentración de esteres de fósforo orgánico, que es hidrolizado a fósforo inorgánico durante su conservación, el incremento es de 4-5 mg/dL por día ⁵. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación del fosforo^{3,4}.

NOTAS

- La mayoría de detergentes utilizados para el lavado de material contienen quelantes y fosfatos que interfieren en el ensayo.
Se recomienda limpiar el material con ácido nítrico diluido y enjuagar abundantemente con agua desionizada.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- BSM dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFIA

- Farrell E C. Phosphorus. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1072-1074 and 418.
- Daly J A. et al. Clin Chem 1972; 18 (3): 263-265.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACC 2001.
- Burtis A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACC 1995.

Phosphorus. Phosphomolybdate. UV
Quantitative Determination of phosphorus
Only for *in vitro* use in clinical laboratory
Store at 2-8°C

Ref.: PHO-012

2 x 125 mL
CAL: 1 x 5 mL

PHOSPHORUS



PRINCIPLE OF THE METHOD

Direct method for determining inorganic phosphate.
Inorganic phosphate reacts in acid medium with ammonium molybdate to form a phosphomolybdate complex with yellow color.
The intensity of the color formed is proportional to the inorganic phosphorus concentration in the sample^{1,2}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Phosphorus is an essential mineral for tissue bone formation and is required by every cell in the body for normal function. Approximately 85% of the body phosphorus is found in bone and in teeth.
Low levels of phosphorus, can be caused by hypervitaminosis D, primary hyperparathyroidism, renal tubular disorders, antacids or malabsorption.
High levels of phosphorus can be caused by diet, bone metastases, liver disease, alcohol ingestion, diarrhea and vomiting^{1,5,6}.
Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

R	Ammonium molybdate	0,40 mM
Molybdic	Sulphuric acid (SO ₄ H ₂)	210 mM
	Detergents	
PHOSPHORUS CAL	Phosphorus aqueous primary standard 5 mg/dL	

PRECAUTIONS

R: H314-Causes severe skin burns and eye damage.
Follow the precautionary statements given in MSDS and label of the product.

PREPARATION

Reagent and Standard are ready to use.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.
Do not use reagents over the expiration date.

PHOSPHORUS CAL Once open is stable up to 1 month when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 340 nm $\geq 0,54$.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 340 nm.
- Matched cuvettes 1,0 cm light path.
- General laboratory equipment ^(Note 1).

SAMPLES

- Serum or plasma^{1,5}:
Free of haemolysis. Serum or plasma should be removed from the clot as quickly as possible to avoid elevation of serum phosphorus from hydrolysis or leakage of phosphate present in erythrocytes.

Stability: 7 days at 2-8°C.

- Urine^{1,2} (24 h):
Collect the specimen into a bottle containing 10 mL of 10% v/v hydrochloric acid (HCl) to avoid phosphate precipitations. Adjust to pH 2. Dilute the sample 1/10 with distilled water. Mix. Multiply the result by 10 (dilution factor). Stability: 10 days at 2-8°C.

PROCEDURE

- Assay conditions:
Wavelength: 340 nm
Cuvette: 1 cm. light path
Temperature: 37°C / 30°C / 25°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette:

	Blank	Standard	Sample
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Standard ^(Note 2,3) (μL)	--	10	--
Sample (μL)	--	--	10
- Mix and incubate for 5 minutes.
- Read the absorbance (A) of the samples and Standard, against the Blank.

CALCULATIONS

Serum: $\frac{(A)Sample - (A)Blank}{(A)Standard - (A)Blank} \times 5$ (Standard conc.) = mg/dL of

phosphorus

Urine 24 h: $\frac{(A)Sample - (A)Blank}{(A)Standard - (A)Blank} \times 5 \times \text{vol. (dL) urine 24 h}$ = mg/24 h of

phosphorus

Conversion factor: mg/dL x 0,323 = mmol/L.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures.
If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and calibrator for problems.
Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES¹

Serum or plasma:

Children 4,0 – 7,0 mg/dL $\equiv$ 1,29 – 2,26 mmol/L
Adults 2,5 – 5,0 mg/dL $\equiv$ 0,80 – 1,61 mmol/L

Urine:

Adults 0,4 – 1,3 g /24 h

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of 0,000mg/L to linearity limit of 35 mg/dL.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
Mean (mg/dL)	4,09	7,12	4,11	7,09
SD	0,03	0,046	0,09	0,06
CV (%)	0,62	0,80	2,15	0,80

Sensitivity: 1 mg/dL = 0,0798 A.

Accuracy: Results obtained using BSM reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r)²: 0,8577.

Regression equation: y = 0,724x + 0,837.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

Hemolyzed specimens are unacceptable because erythrocytes contain high concentrations of organic phosphate esters, which can be hydrolyzed to inorganic phosphate during storage. Inorganic phosphate increases by 4 to 5 mg/dL per day⁵. A list of drugs and other interfering substances with phosphorus determination has been reported by Young et. al^{3,4}.

NOTES

- PHOSPHORUS CAL.: Proceed carefully with this product because due its nature it can get contaminated easily.
- Most of the detergents and water softening products used in the laboratories contain chelating agents and phosphates. It is recommended to rinse glassware in diluted nitric acid and water before using.
- Calibration with the aqueous standard may cause a systematic error in automatic procedures. In these cases, it is recommended to use a serum Calibrator.
- Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
- BSM has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.**

BIBLIOGRAPHY

- Farrell E.C. Phosphorus. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1072-1074 and 418.
- Daly J A. et al. Clin Chem 1972; 18 (3): 263-265.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACC 2001.
- Burtis A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACC 1995.