

Fosfato inorgánico por Fiske-Subbarow. Comparación de macro y micrométodo

Por:

Dra. MARTHA DEL VALLE PUPO*, Téc. CELIA VELÁZQUEZ** y Téc. MAYRA PAGÉS***

Pupo, M. del Valle y otros. Fosfato inorgánico por Fiske-Subbarow. Comparación de macro y micrométodo. Rev Cub Med 21: 4, 1982.

Se realiza la determinación de fosfatos inorgánicos en 20 sueros de pacientes diferentes, usando el método de Fiske-Subbarow modificado y reduciendo muestras y reactivos 10 veces, obteniendo un índice de prueba t de 0,0428, por lo que se llegó a la conclusión de que ambos pueden usarse con iguales resultados.

INTRODUCCION

El fósforo inorgánico se encuentra ampliamente distribuido en líquidos y sólidos que ingerimos en forma de alimentos, pero no libre sino formando fosfatos, y entran a formar parte de los líquidos extra e intracelular.¹

Dichos fosfatos pueden existir en el organismo como: $HP04^{2-}$ y $H2P04^{-}$, en dependencia del pH sanguíneo, asociados a otros minerales, representado por las sales del ácido pirofosfórico y ortofosfórico y en combinaciones orgánicas con lípidos (cefalina y lecitina), glúcidos, nucleótidos y nucleoproteínas.³

Puede decirse que los fosfatos constituyen el principal anión del líquido intracelular, interviniendo prácticamente en todos los procesos metabólicos, principalmente el glucídico y lipídico y no debemos olvidar su importante función en la osteogénesis.⁴

Las alteraciones de los fosfatos resultan inversas a las del calcio. Podemos encontrar fosfato bajo en: el raquitismo, el hiperparatiroidismo, la enfermedad de Von Recklinghausen e hiperfosfatemia en: la insuficiencia renal crónica, el hipoparatiroidismo, *y la hipervitaminosis D, entre otras.⁵

* Especialista de I grado en laboratorio clínico del Instituto de Nefrología.

** Técnico del hospital pediátrico provincial docente, Holguín.

*** Técnico del Instituto de Nefrología, La Habana.

Su concentración en sangre depende fundamentalmente de la acción de la paratohormona y la eliminación renal, en condiciones normales.⁶

Su cifras son algo mayores en el niño, debido al desarrollo óseo y en la mujer embarazada por aumento de las demandas.

Realmente no debe llamarse fósforo a la determinación en el laboratorio, sino fosfato.⁷

En los métodos con que contamos, generalmente se usa 1 ml de suero, y nos dimos a la tarea de comprobar si los resultados eran los mismos, usando reactivos ya adquiridos, pero en menor cantidad, y de la misma forma reducir la muestra, trabajo que resultaría útil en pediatría. Con esa idea se comprobó e implantó en el Hospital Pediátrico Provincial Docente de Holguín y nuevamente en el Instituto de Nefrología.

MATERIALES Y METODOS

Fueron procesados 20 sueros de diferentes pacientes, a quienes se les determinó fosfato inorgánico por el método de Fiske-Subbarow modificado, en su forma original y reduciendo muestra y reactivos 10 veces.

Materiales y equipos

1. Jeringuilla de 10 ml.
2. Aguja 20 G por 1.
3. Tubitos plásticos Eppendorf.
4. Fotómetro de bandas espectrales Eppendorf.
5. Pipetas graduadas de 1,5 y 10 ml.
6. Tubos de ensayo de cristal de 13 por 100 y 13 por 150.
7. Papel de filtro.
8. Embudos.
9. Pipetas semiautomáticas Eppendorf de 20 y 100 microlitros
10. Centrífuga T-23.
11. Centrífuga Eppendorf.

Reactivos

1. Acido tricloroacético al 5% p/v.
2. Molibdato de amonio al 2,5%.
Disolver 12,5 g de molibdato de amonio en 100 ml de agua destilada, agregar 150 ml de ácido sulfúrico 10 N, mezclar y disolver, completar a 500 ml con agua destilada. Guardar en frasco de polietileno, dura indefinidamente a medio ambiente.
3. Acido 1-amino 2-naftol 4-sulfónico (revelador de fosfato).

Bisulfito de sodio	9
Acido 1, 2, 4 aminonaftolsulfónico	9
Agua destilada	70 ml
Disolver, agitando vigorosamente y agregar,	
Sulfito de sodio	10
al 5% p/v.	

Agitar vigorosamente y completar a 100 ml con agua destilada. Guardar en refrigeración, bien tapado, filtrar si fuera necesario. Dura sólo un mes.

4. Matriz de fosfato.

Desecar el fosfato dihidrógeno monopotásico (KH₂PO₄), durante una noche en la estufa, pesar 146,3 mg y disolverlo en 50 ml de agua destilada, completar a 100 ml con agua, agregar unas gotas de cloroformo como preservativo: dura de 6 meses a 1 año.

5. Solución patrón de trabajo.

Solución matriz 1 ml
 Acido tricloroacético al 5% 99 ml
 mezclar, agregar unas gotas de cloroformo como preservativo.
 Dura pocos días en refrigeración.

Método. Fiske-Subbarow modificado.

Fundamento. Las proteínas del suero se precipitan con ácido tricloroacético. El filtrado se trata con una solución de molibdato de amonio, formando un complejo ácido fosfomolibdico, que es incoloro, pasando a molibdoso al reducirse con ácido 1, 2, 4-aminonaftolsulfónico, dando un color azul, proporcional a la concentración de fosfatos presentes en la muestra.^{3, <M>}

Proceder

Macrométodo:

1. Previa desinfección de la zona escogida para la canalización de vena, con alcohol de 70 grados, extraemos 5 ml de sangre y lo echamos en un tubo seco 13 por 100.
2. Después de la retracción del coágulo, centrifugar 10 minutos a 2500 rpm y decantar el suero lo antes posible para evitar la acción de las fosfatasas de los hematíes.
 Suero i ml
3. Realizar filtrado libre de proteínas al suero,
 Acido tricloroacético al 5% 9 ml
 mezclar, dejar en reposo 15 minutos y filtrar.
4. Rotular nuevos tubos, señalando muestra (M) y patrón (P).

	IM)	(P)
del filtrado	3 ml	—
solución patrón		3 ml
molibdato de amonio al 2,5%	1 ml	1 ml
ácido 1, 2, 4-aminonaftolsulfónico	0,4 ml	0,4 ml

 mezclar, dejar en reposo 10 minutos en la oscuridad, leer frente a blanco de ácido tricloroacético al 5%, en banda roja del espectro (filtro 578 mm del Eppendorf),

Micrométodo

- Colocar 1 ml de sangre en un tubo plástico Eppendorf.
- Después de la retracción del coágulo, centrifugar 2 minutos en la centrífuga Eppendorf.
- Realizar filtrado libre de proteínas al suero.

suero	1 ml
ácido tricloroacético	0,9 ml

 agitar 2 minutos en agitadora Eppendorf, dejar en reposo 15 minutos.
- Centrifugar 2 minutos y rotular nuevos tubos, señalando muestra (M) y (P) patrón.

	(M)	(P)
del sobrenadante	0,3 ml	—
solución patrón	—	0,3 ml
molibdato de amonio al 2,5%	0,1 ml	0,1 ml
ácido 1, 2, 4-aminonaftolsulfónico	0,04 ml	0,04 ml

 mezclar, dejar en reposo 10 minutos en la oscuridad y leer frente a blanco de ácido tricloroacético al 5%, con filtro 578 nm en el Eppendorf.

Cálculos:

$$D.O.M. \times \frac{C.P.}{D.O.P.} = C.M.$$

el patrón equivale a 4 mg%.

Para el análisis de los resultados obtenidos, fue aplicado el test T, usando las fórmulas siguientes:^{10,11}

$$DS = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x} - x)^2}{n - 1}}$$

$$DS_{dif} = \sqrt{\frac{DS_1^2}{n^2} + \frac{DS_2^2}{n^2}}$$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{DS_{dif}}$$

DS = desviación *standard*

$\sum(\bar{x} - x)^2$ = sumatoria del promedio, menos el valor individual al cuadrado.
 $n - 1$ = número de muestras menos 1
 DS_{dif} = desviación standar diferencial
 t = índice de prueba t

α = límite de confianza 0,05 ($n_1 + n_2$) — 2 grados de libertad.

RESULTADOS

Los resultados por macrométodo fueron los siguientes: promedio (\bar{x}) 4,95. La desviación *standard* (DS) 2,2987. Los datos primarios se ofrecen en el cuadro I.

CUADRO I
FOSFATO INORGANICO POR FISKE-SUBBAROW.
DATOS OBTENIDOS POR MACROMETODO

N	x	$\bar{X} - x$	$(x - \bar{x})^2$
1	2	2,95	8,70
2	2,4	2,55	6,50
3	2,6	2,35	5,52
4	4	0,95	0,90
5	1,9	3,05	9,30
6	4	0,95	0,90
7	3,5	1,45	2,10
8	8	3,05	9,30
9	2	2,95	8,70
10	6	1,05	1,10
11	6,2	1,25	1,56
12	7	2,05	4,20
13	5,6	0,65	0,42
14	8	3,05	9,30
15	6,4	1,45	2,10
16	9,4	4,45	19,80
17	6	1,05	1,10
18	7	2,05	4,20
19	4	0,95	0,90
20	3	1,95	3,80

Fuente: propia del trabajo.

Por micrométodo obtuvimos un promedio de: 4,975 y una desviación *standard* de: 2,2526. Los datos primarios aparecen en el cuadro II.

Para aplicar el test T fue calculada la desviación *standard* diferencial, dando cifras de: 0,7 y el índice de prueba t un valor de 0,0428. Estos datos se ofrecen en el cuadro III, conjuntamente con la comparación de los dos grupos de datos.

CUADRO II

FOSFATO INORGANICO POR FISKE-SUBBAROW.
DATOS OBTENIDOS POR MICROMETODO

N	x	$\bar{x} - x$	$(\bar{x} - x)^2$
1	2,1	2,88	8,29
2	2,3	2,68	7,18
3	2,4	2,58	6,65
4	4	0,98	0,96
5	2,1	2,88	8,29
6	4	0,98	0,96
7	3,5	1,48	2,19
8	8,2	3,22	10,37
9	2,3	2,68	7,18
10	5,8	0,82	0,67
11	6,4	1,42	2
12	7	2,02	4
13	5,6	0,62	0,38
14	8	3,02	9,12
15	6,2	1,22	1,49
16	9,1	4,12	16,97
17	6	1,02	1
18	7,2	2,22	4,93
19	4	0,98	0,96
20	3,3	1,68	2,82

Fuente: propia del trabajo.

CUADRO III

FOSFATO INORGANICO POR FISKE-SUBBAROW.
COMPARACION POR MACRO Y MICROMETODO

	macrométodo	micrométodo
N	20	20
X	4,95	4,98
DS	2.2987	2,2526
DSdif	0,7	
t	0,0428	

Fuente: propia del trabajo.

DISCUSION

Según los resultados obtenidos el índice de prueba t, está por debajo de 2,021, que es el que ofrece la tabla consultada ofrecida por *Klaus Thielmann* Si el t práctico es menor que el t teórico, quiere decir que entre ambos métodos no hay diferencia significativa. Si los resultados fueran iguales que los presentados en la tabla, el 95% de los resultados serían idénticos y un 5% diferentes, pero como el t práctico dio valores tan bajos, puede decirse que cualquier muestra dará los mismos resultados.

CONCLUSIONES

1. Ambos métodos pueden ser aplicados con iguales resultados.
2. Entre ambos no hay variación significativa.
3. La contabilidad es totalmente completa, dando el valor obtenido del índice de prueba t.

SUMMARY

Valle Pupo, M. del, et al. *Inorganic phosphate determination by Fiske-Subbarow method. Macro and micromethod comparison. Rev Cub Med 21: 4, 1982.*

Inorganic phosphates determination in 20 different patients' sera was performed using Fiske-Subbarow modified method and reducing for 10 times samples and reactivs, obtaining 0,0423 as test t index, because that, it was found out as conclusión, both methods can be used with equal results.

RÉSUMÉ

Valle Pupo, M. del, et al. *Détermination du phosphate inorganique par la méthode de Fiske-Subbarow, Comparaison de la macro et de la micro-méthode Rev Cub Med 21-4, 1982.*

Il est réalisé la détermination de phosphates inorganiques sur 20 sérums de différents patients, au moyen de l'emploi de la méthode de Fiske-Subbarow modifiée et par réduction des échantillons et de réactifs (10 fois), L'indice d'épreuve t obtenu a été de 0,0428; donc on a conclu que les deux peuvent être utilisées avec des résultats similaires.

PE3KME

¿Iajn, Bffffl e nyno. M. h np. HeopraHH^eckfñ \$00^? npa npHMOHS
HHB M8TOñ3 Fiklte-Subbarow # CpaBHQHHe M8KD0 H MHKPOM9TOJI8. Rev
Cub Med 218 1982.

lipoBOSHTCSH onpei8Ji0Hae HeopraHH^eckoro \$oc<|)aTa b 20 chbopot - kcx pasjmHHx nauqaeHTOB npuMOHaa npa 8tom B3MenéHHHX m8tos pí feke-Subbarow O H3M0H8HR8M H nOHUK8HH6M 0<5pa3E(0B B peaKTHBOB "5 TOH8HHO 10 pa3. npa 9tom óhji noJiyqeH noKa3aT8jn. npóK t , paB eh3 0,0428, b pe3yjtBTaTe ^ero npaxojHM k BHBoay, hto oda moto aa woryT óhtí HoncxsoBaHH c oxrh&J(obhmh pesy^TaTMH.

BIBLIOGRAFIA

1. Guyton, A.: Tratado de Fisiología Médica. 2da. ed. Edic. Rev. La Habana, 1966. P. 39
2. Lynch, R.: Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology. 2da. ed. La Habana. Instituto Cubano del Libro. 1972. Pp. 337-338
3. Mas Martin, J. C. y colaboradores: Laboratorio Clínico. La Habana Edit. Ciencia y Técnica. Instituto Cubano del Libro. 1968. P. 93.
4. Guyton, A. Tratado de Fisiología Médica. 2da. ed. La Habana. Edic. Rev. 1966. P. 864
5. Mas Martin, J. C. y colaboradores: Laboratorio Clínico. La Habana. Edit. Ciencia y Técnica. Instituto Cubano del Libro. 1968. P. 94.
6. Guyton, A. Tratado de Fisiología Médica. 2da. ed. La Habana, Edic. Rev. 1966 p. 955.
7. Henry, R. J. y colaboradores: Química Clínica. Bases y Técnicas. Vol. I. 2da. ed. España, Edit. Jims. 1980. p. 729.
8. Manual Lab-Trol. Dade Reagents. INC. Miami, Florida, 1955.
9. Grupo Nacional de Laboratorios Clínicos. Manual de Técnicas para Laboratorios. La Habana. Edit. Ciencia y Técnica. Instituto Cubano del Libro. 1919. P. 36.
10. Thielmann, K.: Principios de metodología en bioquímica clínica. La Habana. Edit. Organismos. Instituto Cubano del Libro. 1973. // Pp. 58-62.
11. Henry, R. J. y otros: Química clínica. Bases y técnicas. Vol. I. 2da. ed. España, Edit. Jims. España, 1980. P. 324.

Recibido: 3 de octubre de 1981.

Aprobado: 18 de noviembre de 1981.

Dra. Marta del Valle Pupo Ave. 9na.
No. 4409 e/ 44 y 46 Miramar,
Municipio Playa,
Ciudad de La Habana.