

Validación del método ultravioleta para determinar fósforo en suero

Validation of ultraviolet method to determine serum phosphorus level

Lisandra García Borges^I; Teresa María Pérez Prieto^{II}; Lilliam Valdés Díez^{III}

^IMaestra en Ciencias Tecnología y Control de Medicamentos. Especialista en Producciones Farmacéuticas. Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay". La Habana, Cuba.

^{II}Técnico en Química Industrial. Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay". La Habana, Cuba.

^{III}Maestra en Ciencias Bioquímicas. Investigador Titular. Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se presentó la validación de un método espectrofotométrico aplicable en los laboratorios clínicos para la determinación analítica de fosfatos en suero, con el uso del juego de reactivos fósforo-UV de producción nacional de la Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay" (La Habana, Cuba). El método de análisis se fundamentó en la reacción del fósforo con amonio molibdato a pH ácido para formar un complejo medible a 340 nm. Se evaluaron la especificidad y precisión teniendo en cuenta la robustez del método, linealidad, exactitud y sensibilidad del método. El método analítico resultó ser lineal hasta 4,8 mmol/L, preciso (CV < 3 %) y exacto (% recuperación 98 a 102 %; $r \geq 0,999$) en el intervalo de concentraciones de interés clínico, donde no se registraron interferencias por la matriz. Los valores para el límite de detección fueron de 0,037 mmol/L y de cuantificación de 0,13 mmol/L, ambos satisfactorios para el uso al que se destina el producto.

Palabras clave: Fósforo, espectrofotometría, laboratorio clínico, diagnóstico clínico.

ABSTRACT

Validation of a spectrophotometry method applicable in clinic labs was proposed to analytical assessment of serum phosphates using a kit UV-phosphorus of domestic production from "Carlos J. Finlay" Biologics Production Enterprise (Havana, Cuba). Analysis method was based on phosphorus reaction to ammonium molybdenum to acid pH to creating a measurable complex to 340 nm. Specificity and precision were measured considering the method strength, linearity, accuracy and sensitivity. Analytical method was linear up to 4,8 mmol/L, precise (CV < 3 %) and exact (% recovery 98 to 102 %; $r \geq 0.999$) during clinical interest concentration interval where there were not interferences by matrix. Detection limit values were of 0.037 mmol/L and of quantification of 0.13 mmol/L both were satisfactory for product use.

Key words: Phosphorus, spectrophotometry, clinical lab, clinical diagnosis.

INTRODUCCION

La obtención de diagnosticadores que cubran todas las líneas de determinaciones analíticas de Química Clínica con las que se obtengan respuestas confiables y reproducibles en los resultados del laboratorio, constituye una gran prioridad para la industria médica de Cuba, con el objetivo de brindar un mejor servicio en la detección de diferentes afecciones.

El fósforo es un elemento importante, ampliamente distribuido en el organismo humano; se encuentra en el cuerpo casi exclusivamente en forma de fosfato, principalmente en la sustancia ósea inorgánica y constituye el principal anión encontrado dentro de las células, componente estructural de sustancias fisiológicamente importantes: fosfolípidos y los ácidos nucleicos, así como en el adenosintrifosfato, que constituye una significativa fuente de energía. La determinación de fósforo en el suero y en la orina se realiza principalmente para detectar las enfermedades renales, óseas, nutricionales, endocrinológicas y de las glándulas paratiroides.¹

La técnica utilizada en los laboratorios cubanos para evaluar este indicador involucra la determinación fotométrica del azul de molibdeno formado por reducción del molibdodifosfato, basado en el método propuesto por *Fiske y Subbarow (1925)*, proceso este bastante complejo e indudablemente heterogéneo.^{2,3} Este método tiene 2 inconvenientes fundamentales: baja estabilidad del color de la reacción y paso previo de desproteinización de la muestra.

Con el juego de reactivo FOSFORO-UV (Laboratorios Finlay, La Habana, Cuba) que comenzó a producirse tras un estudio riguroso de diseño y evaluación, se eliminan las dificultades durante la fase analítica en el laboratorio. Se presenta como monoreactivo listo para su uso, basado en una modificación al método propuesto por *Daly y Ertingshausen (1972)*.⁴ El fundamento de la técnica se basa en la reacción de los fosfatos con el ion molibdato en medio ácido para formar un complejo inorgánico molibdato fosfórico con un máximo de absorción a 340 nm. El objetivo del presente trabajo consistió en la validación del método analítico con vistas a su introducción como diagnosticador en los laboratorios cubanos.

MÉTODOS

La validación del método analítico se realizó en la UEB Desarrollo e Innovación Tecnológica de la Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay" (La Habana, Cuba) con un lote de escalado del juego de reactivos FOSFORO-UV. El juego consta de un monoreactivo: solución molibdato-UV y la solución de referencia de fósforo 1,60 mmol/L. Se emplearon soluciones de referencia de producción nacional (Laboratorios Finlay, La Habana), suero control de la firma comercial Roche de procedencia alemana con valores normales (Precinorm U lot. 155 977) y con valores patológicos (Precipath U lot. 196 563) y un juego de reactivos fósforo-UV de la firma comercial Roche (Phos-5600 Lot A20235).

Los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer modelo LAMBDA EZ201 a una longitud de onda de 340 nm. Para el procedimiento analítico se midieron 20 µL de muestra o solución de referencia de fósforo y se añadieron 2 mL de reactivo solución molibdato-UV, se dejó reposar de 3 a 5 min a temperatura ambiente y se leyó contra ensayo blanco reactivo a 340 nm. La concentración de fósforo en la muestra se calculó según la expresión:

$$C = \frac{\text{abs}(m) \cdot Cr}{\text{abs}(r)} \text{ mmol/L}$$

donde:

C: concentración de fósforo en la muestra (mmol/L).

Abs(m) y Abs(r): absorbancia de la muestra y absorbancia de la referencia.

Cr: concentración de fósforo en la solución de referencia (mmol/L).

Se evaluaron los parámetros de especificidad, linealidad, precisión, robustez, exactitud y sensibilidad.

Se realizó el estudio de especificidad a través del ensayo de paralelismo con el empleo de soluciones acuosas de fósforo y en diluciones de una muestra biológica que abarcó el mismo intervalo de concentraciones.

La linealidad se evaluó en el intervalo de concentraciones de interés clínico (entre 0,8 y 4,8 mmol/L), lo que equivale a valores del 25 al 150 % de la cantidad teórica declarada, para lo cual se emplearon soluciones de referencia de producción nacional. Se efectuaron 3 réplicas para cada uno de los puntos de la curva; los resultados se procesaron en el programa estadístico SPSS para Windows y se determinaron las variables relacionadas con la regresión y correlación, la proporcionalidad y el coeficiente de variación del factor respuesta.

El estudio de precisión se efectuó para la repetibilidad, con la utilización de 3 valores de concentraciones: normales y patológicos bajo y alto según aparecen reportados en la literatura para el método,⁵ se realizaron 8 réplicas de cada concentración. La precisión intermedia se realizó en 3 días diferentes. En el análisis estadístico se obtuvieron los coeficientes de variación entre los valores obtenidos en el día y entre las corridas.

En el estudio de robustez se evaluaron los factores que más afectan la determinación en los laboratorios: analistas, técnica de análisis: manual y automatizada, tiempo de desarrollo de la reacción, temperatura de incubación y de almacenamiento. En el análisis estadístico se determinó la diferencia entre los factores a través de la tabla de Youden y Steiner, en valor absoluto y se comparó con $2\sqrt{DE}$, donde DE es la desviación estándar obtenida en el estudio de repetibilidad para el punto correspondiente al valor normal del analito en suero.

La exactitud se realizó mediante el ensayo de Cochran a partir del análisis de los porcentajes de recuperación a concentraciones de 50, 80, 100, 120, 150 % de la muestra, en cada caso se evaluaron 3 réplicas. Además se hizo un estudio por comparación de métodos donde fue evaluado la exactitud del ensayo funcional al comparar el método empleado con el método fósforo-UV de la firma Roche, con 130 muestras de diferentes concentraciones; en este caso se determinó el coeficiente de correlación lineal, de determinación y la pendiente entre ambos métodos.

La sensibilidad del ensayo funcional fue estimada a partir de la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración, para lo que se utilizaron 3 concentraciones inferiores al menor valor de la curva de calibración.⁶

RESULTADOS

Los resultados del estudio de especificidad y linealidad se muestran en la [tabla 1](#). La especificidad en soluciones acuosas y en suero, proporcionó 2 curvas de calibración con pendiente y desviación estándar muy similares para ambos casos, en el mismo intervalo de concentración analizado. En el estudio de linealidad los valores de correlación y determinación resultaron mayores que 0,99, con un intercepto en valores muy próximos a cero, con un nivel de significación de 0,05.

Tabla 1. Resultados de la especificidad y linealidad de la técnica analítica método UV

	Parámetro	Resultado	Criterio
Especificidad	Ensayo de paralelismo	$m_{\text{suero}} = 0,99939 \pm 0,011$ $m_{\text{solución acuosa}} = 0,99938 \pm 0,00797$	Rectas superpuestas o paralelas
Linealidad		$r = 0,9994$; $r^2 = 0,9988$	$r \geq 0,99$ $r^2 \geq 0,98$
		CVf = 1,57 %	CVf < 5 %
		ICa: $-0,0127 < x < 0,0013$	Debe incluir el cero

m : pendiente de la recta; los valores se representan como media \pm desviación estándar;
r: coeficiente de correlación; r^2 : coeficiente de determinación; CVf: coeficiente de variación de los factores respuesta; ICa: intervalo de confianza del intercepto

En la [tabla 2](#) se presentan los resultados del estudio de precisión y exactitud. Los valores del coeficiente de variación para la repetibilidad y la precisión intermedia, en el estudio de precisión, a los diferentes valores de concentración estudiados fueron menores del 3 %, límite permisible de un método analítico espectrofotométrico para el diagnóstico de iones. Al comparar la variación entre días no se obtuvo diferencia significativa; con la prueba de Fisher se obtuvo una F_{exp} F_{tab} para una probabilidad de 0,05 y con la prueba de la t de Student, el valor calculado entre las medias de los días resultó menor que el tabulado para el 95 % de confianza.

Tabla 2. Resultados de la precisión y exactitud de la técnica analítica método UV

	Parámetro	Resultado			Criterio
		Patológico bajo	Normal	Patológico alto	
Precisión	Repetibilidad X ± DE	0,67 ± 0,014	1,25 ± 0,018	2,24 ± 0,031	
		CV= 2,03 %	CV= 1,44 %	CV=1,38%	CV < 3 %
	Precisión intermedia X ± DE	0,68 ± 0,015	1,26 ± 0,017	2,24 ± 0,033	
		CV= 2,15 %	CV=1,36 %	CV=1,48 %	CV < 3 %
		F _{exp} = 0,76	F _{exp} = 0,41	F _{exp} =0,745	F _{exp} < F _{tab} F _{tab} = 2,75
		t _{exp} = 0,171	t _{exp} = 0,29	t _{exp} = 0,93	t _{exp} < t _{tab} t _{tab} = 2,14
Robustez	Analista= -0,0075 Técnica de análisis= -0,027 Tiempo de desarrollo de la reacción= -0,027 Temperatura de incubación= -0,023 Temperatura de almacenamiento= 0,012			Y < 2√DE= 0,035	
Exactitud	G _{exp} = 0,4710; G _{tab} = 0,5981			G _{exp} < G _{tab}	
	% de recuperación; 50% = 99,85 % 80 % = 99,71 % 100 % = 99,97 % 120 % = 99,99 % 150 % = 99,75 %			98-102 %	
	Comparación de métodos: r = 0,999; r ² = 0,999; m = 1,022			r ≥ 0,99 r ² ≥ 0,98 m ≥ 1,00	

X ± DE: media (mmol/L) ± desviación estándar; CV: coeficiente de variación; F: prueba de Fisher. Anova de clasificación simple; t: prueba de la t de Student; Y: factores estudiados en la robustez; G: prueba de Cochran; r: coeficiente de correlación; r²: coeficiente de determinación; m: pendiente.

En el estudio de robustez las diferencias entre los factores de las variables definidas, en valor absoluto, son menores que 2√DE, donde DE es la desviación estándar obtenida en el estudio de repetibilidad para el punto correspondiente al valor normal del analito en suero.

La exactitud del método con los 2 ensayos aplicados, responden al criterio aceptado en cada caso. Con el análisis por triplicado de muestras con diferentes concentraciones conocidas de fósforo, se obtuvo que el estadígrafo G_{exp} G_{tab}, para el 95 % de confianza, lo cual indica que no existe diferencias significativas y las varianzas de las concentraciones evaluadas son equivalentes. Los porcentajes de recuperación a las diferentes concentraciones analizadas, de interés clínico, son mayores del 98 % y no sobrepasan el 102 %, por lo cual la cantidad de analito recuperado no es significativa.

En la comparación de métodos del juego de reactivos de fósforo-UV con un homólogo de la firma comercial Roche, en muestras de pacientes, se demuestra que el resultado es altamente significativo a partir de que se obtienen coeficientes de determinación y de correlación superior a 0,990; las líneas de regresión estimadas se ajustaron de forma satisfactoria a los valores observados en los estudios que se realizaron y las pendientes de las rectas de mejor ajuste coinciden con el término unitario.

El estudio de sensibilidad, los valores obtenidos para el límite de detección (LOD) 0,037 mmol/L y para el límite de cuantificación (LOQ) 0,130 mmol/L, estimada mediante el valor de la ordenada en el origen expresado en unidades de concentración, son satisfactorios para el uso al que se destina el producto.

DISCUSIÓN

La validación de un método analítico es imprescindible porque proporciona un alto grado de confianza en la ejecución y resultados que se obtienen, además de que brinda criterios de la calidad del producto.

El estudio de especificidad refleja que no existen interferencias por efecto matriz, al obtener rectas paralelas para las curvas preparadas con soluciones acuosas y con suero, por lo que en la respuesta del método analítico no interfieren sustancias como las proteínas plasmáticas, presentes en las muestras de pacientes.

Con los resultados del estudio de linealidad se obtiene buena respuesta en el intervalo de interés clínico. El método es lineal a los valores de concentración analizados, se cumple la ley de Lambert Beer siendo posible trabajar en un intervalo de respuesta de detección con confiabilidad a valores patológicos altos superiores a 2,0 mmol/L. Existe proporcionalidad entre la respuesta analítica y la concentración del analito, al considerar que la relación y/x es casi igual a la unidad con una desviación estándar de la pendiente menor que el valor máximo establecido.⁷

En la precisión se observa una mínima dispersión de los valores a las diferentes concentraciones analizadas, los valores del coeficiente de variación para el estudio garantizan la seguridad del uso al que se destina el reactivo y la posibilidad de contar con un diagnosticador para determinar fósforo en los laboratorios clínicos, que permita obtener resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una misma muestra, sin variabilidad significativa entre los días.

El estudio de robustez da criterios de calidad y fiabilidad del producto, al evaluar diferentes variables importantes en las condiciones operacionales del análisis en la rutina del laboratorio. Considerando este aspecto se analizaron los parámetros que más variaciones pueden presentar de acuerdo a la infraestructura y las características del trabajo particular de los diferentes laboratorios.

La evaluación de la variable "analista" es imprescindible en todos los métodos analíticos, ya que constituye una fuente potencial de variabilidad debido a la capacidad para ejecutar los ensayos en el laboratorio que presenta un técnico con respecto a otro. La temperatura de almacenamiento del reactivo se toma en cuenta por ser un parámetro relacionado con la estabilidad del producto y la reacción. La influencia del equipo, por la diversidad del equipamiento instalado; el desarrollo de la técnica: manual, semiautomatizada o automatizada; temperatura de incubación; y el tiempo de desarrollo de la reacción definen la respuesta final de la reacción: la absorbancia; de no tenerse en cuenta todas estas variables no se obtendría el valor real de concentración del analito en estudio.

Las diferentes variables estudiadas cumplen con el criterio de aceptación establecido, incluyendo las variables relacionadas con el equipo de medición, con las que se obtuvo mayor diferenciación, esto se debe principalmente a que la técnica corresponde a un método espectrofotométrico donde los resultados se ven afectados por características propias de las lámparas empleadas en el equipo, la fatiga de los detectores, diferencias de la linealidad de los amplificadores, o a causas externas que provoquen deficiencias como las variaciones del voltaje, período de vida de las lámparas, esquema de programación de las técnicas, entre

otros. Por lo que el método es robusto y aplicable a las diferentes condiciones del laboratorio.

Con el ensayo de homogeneidad de varianzas de grupos muestrales de igual tamaño (prueba G de Cochran), se observó que las varianzas no difieren significativamente, lo que permite concluir que este factor no afecta la exactitud del método y por tanto la concentración no es determinante en la variabilidad de los resultados. Los porcentajes de recuperación a concentraciones patológicas bajas y altas así como a concentraciones normales de fósforo en suero, indican que no existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 % de recuperación.

Con la comparación de métodos se puede analizar las ventajas o desventajas del método de estudio a partir de un producto de referencia.⁶El estudio del juego de reactivo fósforo-UV con muestras de pacientes del Instituto de Nefrología (La Habana, Cuba) con valores normales y patológicos, en paralelo con el juego de la firma comercial permitió estimar la fiabilidad en los resultados, al obtenerse resultados altamente significativos en la exactitud.

Los valores obtenidos en el estudio de sensibilidad son satisfactorios para el uso al que se destina el producto, debido a que en algunas afecciones asociadas a la hipofosfatemia como son anomalías hematológicas y deformación neuromuscular, el fósforo se encuentra $\geq 0,3$ mmol/L, en raras ocasiones este valor resulta inferior.

La determinación de fósforo en suero en niveles inferiores a 0,8 mmol/L y superiores a 2,5 mmol/L definen en determinadas ocasiones entre el estado normal y patológico del paciente debido a la relación del fósforo con la alimentación y variaciones en la secreción de hormonas paratiroideas que puedan disminuir su concentración hasta 0,3 mmol/L, a consecuencia de la administración de medicamentos como son el hidróxido de aluminio, epinefrina e insulina; o aumentarlos como la heparina, tetraciclina y antiácidos alcalinos.

Con la validación del juego de reactivos fósforo-UV, se avala la calidad del juego, y se demuestra que el método analítico es preciso, exacto y que responde linealmente en el intervalo de interés médico, lo cual permite realizar las determinaciones en los laboratorios clínicos, con un alto grado de confiabilidad en los diferentes niveles de atención médica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kauffman RA. Method and reagent for the quantitative determination of phosphorus in serum and urine. Patent Application 0351605. 1996
2. Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW. Química Clínica. Bases y técnicas. 2 da ed. Tomo I. Barcelona: Jums; 1980. p. 729-38.
3. Shu FR. Rate method for the determination of inorganic phosphorus. Patent Application 4731331.1988.
4. Daly J. Ertingshausen: direct method for the determining inorganic phosphate in serum with the centrifichem. Clin Chem. 1972; 18(3):263-5.

5. Fraser CG. Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry. *Eur J Clin Biochem.* 1992; 30: 311-7.
6. International Conference on Harmonized (ICH) of technical Requirement for the registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: methodology. Geneve: ICH-Q2B; 1996.
7. Stock D. Validity of linear regression in method comparison studies: is it limited by the stadistical model or the quality of the analytical input data? *Clin Chem.* 1998; 44(11); 2340-6.

Recibido: 16 de julio de 2009.
Aprobado: 20 de agosto de 2009.

M. C. *Lisandra García Borges*. Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay". Infanta No.1162, municipio Centro Habana, La Habana, Cuba. Correo electrónico: lisygarcia@finlay.quimefa.cu