

Método

Colorimétrico.

Finalidade

Sistema para determinação da creatinina no soro, plasma e urina.
Somente para uso diagnóstico in vitro.

Princípio**Colorimétrico de Ponto Final**

A creatinina e outros componentes presentes na amostra reagem com o picrato em meio alcalino, formando um complexo colorido que é medido fotometricamente.

A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0 decompõe o picrato de creatinina, permanecendo a cor derivada dos cromogênios que também é medida fotometricamente.

Cinético de Tempo Fixo

A creatinina e outros componentes presentes na amostra reagem com o picrato em meio alcalino, formando um complexo colorido. Mede-se a velocidade de formação desse complexo em períodos iniciais curtos, evitando-se assim a interferência de outros compostos. Uma primeira leitura é feita aos 30 segundos iniciais da reação para eliminar o efeito dos interferentes de reação rápida. Aos 90 segundos de reação é feita uma segunda leitura, antes que os interferentes de reação lenta possam interferir. Assim, a determinação fotométrica do produto final fica livre de interferentes, referindo-se exclusivamente à creatinina presente.

Significado Clínico

Sintetizada principalmente no fígado e nos rins, a creatinina é produzida e excretada constantemente independente do grau de hidratação, da dieta, e metabolismo proteico. Essa constância na formação e excreção faz dela um marcador muito útil de função renal, principalmente da filtração glomerular.

A determinação da creatinina plasmática é um teste de função renal mais seguro do que a uréia. Nas doenças renais, a creatinina se eleva mais vagarosamente do que a uréia e se reduz mais vagarosamente com a hemodiálise. A dosagem elevada indica disfunção renal e o grau de evolução da enfermidade. Níveis diminuídos podem ser observados: nas distrofias musculares, desnutrição diminuição da massa muscular, doença renal severa.

Reagentes

Reagente nº 1. Tampão: Conservar entre 15 e 30°C. O reagente em baixas temperaturas pode apresentar turvação; para eliminá-la aquecê-lo a 37°C. Homogeneizar antes de usar. Contém: Hidróxido de Sódio 110 mmol/L, Carbonato de Sódio 75 mmol/L e surfactante. (pH 12,50).

Reagente nº 2. Ácido Pírico: Conservar entre 15 e 30°C. Contém: Ácido Pírico 60 mmol/L.

Reagente nº 3. Padrão: Conservar entre 15 e 30°C. Após o manuseio, conservar na geladeira entre 2 e 8°C para evitar evaporação. Contém: Creatinina 3 mg/dL.

Reagente nº 4. Acidificante: Conservar entre 15 e 30°C. Contém: Ácido Acético 12,25 mol/L.

Estabilidade e Condições de Armazenamento

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo do produto e na embalagem externa quando conservados na temperatura recomendada, bem vedados e se evitado a contaminação durante o uso. A temperatura de armazenamento deverá ser de 15 a 30°C.

Cuidados Especiais e Precauções

- As amostras a serem analisadas devem ser tratadas como material potencialmente infectante.
- Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em www.bioanalitica.com.br ou pelo telefone 0800 006 8111.
- Reagentes de lotes diferentes não devem ser misturados.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
- Os reagentes, tampão e acidificante, são corrosivos. Evite contato com os olhos, pele e mucosa. No caso de contato, lave imediatamente com água em abundância e procure auxílio médico.
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- O tempo de reação, pipetagens e temperatura de trabalho são muito importantes para obtenção de resultados corretos.
- Usar pipetas de vidro e ponteiros descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.
- O nível de água do banho-maria deve ser superior ao dos tubos de ensaio que contém as reações.

Materiais Necessários e Não Fornecidos

- Espectrofotômetro ou fotômetro para leitura em 510 nm (500 - 540);
- Banho-maria, termostatzado a 37°C.

- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Tubos de ensaio;
- Cronômetro.

Amostra

Soro ou plasma (EDTA/ Heparina/Fluoreto). O analito é estável por 7 dias armazenado entre 2 e 8°C. Na urina, o analito é estável por 4 dias entre 2 e 8°C. A amostra de urina de 24 horas deve ser conservada entre 2 e 8°C. A urina deve ser resfriada durante o período de coleta até o momento da dosagem.

Para descarte dos reagentes e materiais biológicos devem-se seguir as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências e Limitações

Aspirina administrada para ação anti-inflamatória induz valores aumentados de creatinina. Dieta vegetariana produz valores mais baixos.

Exercícios físicos elevam os valores de creatinina.

Concentrações de bilirrubina até 17 mg/dL e triglicérides até 855 mg/dL e ácido ascórbico até 20 mg/dL não produzem interferências significativas.

Valores de hemoglobina maior que 279 mg/dL e produzem interferências significativas nas amostras.

Procedimento Técnico**Método Ponto Final**

Identificar 3 tubos de ensaio: B (Branco), T (Teste), P (Padrão) e proceder como a seguir:

Reagentes	Branco	Teste	Padrão
Tampão (1)	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Água Destilada	0,25 mL	-----	-----
+Amostra	-----	0,25 mL	-----
Padrão (3)	-----	-----	0,25 mL
Ácido Pírico (2)	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL

Homogeneizar bem e colocar em banho-maria 37°C por 10 minutos.

Ler a absorbância da Amostra e do Padrão em 510 nm (500 - 540 nm), acertando o zero com o Branco. A absorbância do teste será A₁.

Reagente	Branco	Teste	Padrão
Acidificante (4)	0,1 mL	0,1 mL	-----

Homogeneizar e deixar a temperatura ambiente por 5 minutos. Ler a absorbância da Amostra em 510 nm (500 - 540 nm), acertando o zero com o Branco. A cor é estável por 30 minutos. A absorbância do teste será A₂.

Dosagem na Urina

Anotar o volume colhido em mL, centrifugar uma alíquota da amostra de urina a ser dosada e proceder uma diluição de 1:25 (0,1 mL de urina e 2,4 mL de água destilada). Em seguida, fazer a dosagem como na técnica descrita acima. Multiplicar o resultado obtido por 25.

Cálculos

$\text{Creatinina (mg/dL)} = [(A_1 - A_2) \div \text{Absorbância do Padrão}] \times 3$

$\text{Fator de Calibração} = \text{Concentração do Padrão} \div \text{Absorbância do Padrão}$

Exemplo com Padrão

A₁ = 0,108

A₂ = 0,045

Absorbância do Padrão = 0,265

$\text{Creatinina} = [(0,108 - 0,045) \div 0,265] \times 3 = 0,71 \text{ mg/dL}$

Exemplo com Fator de Calibração

Fc = 3 ÷ 0,265 = 11,32

$\text{Creatinina} = (0,108 - 0,045) \times 11,32 = 0,71 \text{ mg/dL}$

Método Cinético de Tempo Fixo**Preparo de Reagente de Trabalho**

Misturar uma parte do Ácido Pírico (2) com quatro partes do Tampão (1). Armazena em frasco âmbar. Estável 24 horas entre 15 e 30°C. Homogeneizar o Reagente de Trabalho antes de iniciar a técnica.

Procedimento da Reação

Identificar dois tubos como Teste e Padrão.

Adicionar 1 mL de Reagente de Trabalho (previamente homogeneizado) e 0,1 mL de Padrão ou Amostra (soro, plasma ou urina), homogeneizar e transferir imediatamente para uma cubeta termostatzada a 37°C. Medir as absorbâncias do Teste e do Padrão em 510 nm (500 - 540 nm) aos 30 e 90 segundos. As leituras serão T₃₀, T₉₀ e P₃₀, P₉₀. Calcular diferença de absorbância entre 90 e 30 segundos (A₉₀ - A₃₀) para o Padrão e para o Teste.

Cálculos

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{3}{P_{90} - P_{30}} = \frac{3}{0,136 - 0,088} = \frac{3}{0,048} = 62,5$$

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = T_{90} - T_{30} \times \text{Fator Calibração} = 0,147 - 0,123 \times 62,5 = 1,5$$

Depuração da Creatinina

Instruir o paciente para que faça uma coleta correta da urina de 12 ou 24 horas. Dosar a creatinina do soro e da urina e aplicar os resultados obtidos na equação abaixo:

$$\text{Depuração (mL/minuto)} = \frac{U}{S} \times \text{VM}$$

$$U = \text{creatinina na urina (mg/dL)} \quad S = \text{creatinina no soro (mg/dL)}$$

$$\text{VM} = \text{volume minuto (Volume urinário de 24 h, em mL, dividido por 1440 min)}$$

A depuração deverá ser corrigida para a superfície corporal do paciente, que é obtida através de nomograma correlacionando peso-altura. Multiplicar o valor da depuração por 1,73 e dividir pela superfície corporal do paciente.

Exemplo

$$\text{Valor Creatinina urina} = 115 \text{ mg/dL} \quad \text{Valor Creatinina soro} = 1,5 \text{ mg/dL}$$

$$\text{Volume de 24 horas} = 1670 \text{ mL}$$

$$\text{Volume minuto} = 1670/1440 = 1,16 \text{ mL/min}$$

$$\text{Depuração} = \frac{115 \times 1,16}{1,5} = 88,9$$

$$\text{Peso} = 68 \text{ Kg} \quad \text{Altura} = 168 \text{ cm} \quad \text{Superfície corporal} = 1,77$$

$$\text{Depuração (corrigida)} = \frac{88,9 \times 1,73}{1,77} = 86,9 \text{ mL/min/1,73 m}^2$$

Comparação de Métodos

O método foi comparado com outro produto com metodologia semelhante através de 40 amostras de soro humano. Através de modelos estatísticos, os resultados foram analisados e resultaram na equação de regressão linear onde Método Bioanalítica (y) = 0,108 + 0,916* Método comparativo (x) e coeficiente de correlação igual a 0,993.

Sensibilidade

Uma amostra proteica não contendo Creatinina, foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio. A média encontrada foi 0,0300 mg/dL equivalente a 20 determinações, com desvio padrão de 0,0084 mg/dL. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde à média mais 3 vezes o desvio padrão, que é igual a 0,0553 mg/dL.

Linearidade

A reação é linear até 10 mg/dL. Para amostras com valores acima de 10 mg/dL, diluir a amostra com Cloreto de Sódio 0,85%, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Repetitividade

A repetitividade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	0,37	0,80	9,60
Desvio Padrão (mg/dL)	0,02	0,03	0,18
Coeficiente de Variação (%)	5,78	3,53	1,90

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 20 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	0,16	1,29	5,43
Desvio Padrão (mg/dL)	0,01	0,06	0,12
Coeficiente de Variação (%)	5,12	4,46	2,15

Valores de Referência

Estes valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores para população atendida. Os resultados dos testes devem ser analisados por um profissional responsável.

Soro /Plasma	Adultos	0,4 – 1,4 mg/dL
	3 a 5 anos	0,26 – 0,42 mg/dL
	7 a 9 anos	0,34 – 0,45 mg/dL
	13 a 15 anos	0,46 – 0,81 mg/dL
Urina	Adulto Masculino	1500 – 2500 mg/24h 21 – 26 mg/kg/24h
	Adulto Feminino	800 – 1500 mg/24h 16 – 22 mg/kg/24h
	Criança 2 a 3 anos	6 – 22 mg/kg/24h
	Criança >3 anos	12 – 30 mg/kg/24h
Depuração da Creatinina	Adulto Masculino	97 – 137 mL/min/1,73 m ²
	Adulto Feminino	88 – 128 mL/min/1,73 m ²
	Crianças	70 – 140 mL/min/1,73 m ²

Para converter os valores de mg/dL em mmol/L (SI) multiplicar por 0,0884.

Controle Interno da Qualidade

O laboratório clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, para assegurar que todos os procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente definidos. Ressaltamos que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica, que deve ser monitorada pelos laboratórios. Portanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens. Sugere-se utilizar soluções estabilizadas da linha de controles e calibradores da Bioanalítica.

Observações

- A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes. A limpeza da vidraria deve ser feita com detergente neutro. O enxágue deve ser exaustivo sendo os últimos com água destilada ou deionizada.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, a água deve ser do Tipo II, com resistividade > 1 megaohms/cm ou condutividade < 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos < 0,1 mg/L. Para o enxágue inicial da vidraria, a água pode ser do Tipo III, com resistividade > 0,1 megahoms ou condutividade < 10 microsiemens. No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna deionizadora com sua capacidade saturada libera água alcalina, vários íons e também substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando de maneira imprevisível os resultados. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências Bibliográficas

- Slot C. Sand J. Clin Lab Invest 1965; 17:381.
- Heinegard D., Tiderstrom. Clin Chim Acta 1973; 43: 305-310.
- Cook JGH. Clin Chim Acta 1971; 32:485 - 486.
- JAFFE, M.: J. Physiol. Chem. 10:381, 1886.
- TODD, SANFORD, DAVIDSOHN: Diagnósticos Clínicos, 16 Ed., Editora Manole, 1983.
- HENRY, R. J.: Clinical Chemistry - Principles and Technics, Ed., Harper and Row. New York, 1964.
- Cerioti F, Boyd JC, Klein G et al. Clin Chem 2008; 54 559 - 566.
- CARL, AB. and EDWARD, RA.: Tietz Textbook of Clinical Chem 2 nd ed., 1994, 1531 - 1539.
- Bioanalítica: Dados internos de arquivo do P&D.

Termos e Condições de Garantia

A Bioanalítica Diagnóstica garante o desempenho e a qualidade deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que utilizados, armazenados e transportados nas condições adequadas.

Apresentação

Ref.	Volume	Reagente 1	Reagente 2	Reagente 3	Reagente 4
BA121-250	250 mL	1 x 200 mL	1 x 50 mL	1 x 10 mL	1 x 10 mL

Bioanalítica Diagnóstica S/A.

Rua Álvares da Silva, 12 - União
CEP: 31160-360 - Belo Horizonte MG - Brasil
Tel. +55 31 3657-0051
www.bioanalitica.com.br
E-mail: bioanalitica@bioanalitica.com.br
CNPJ: 20.264.948/0001-61 - Indústria Brasileira
SAC: 0800 006 8111
E-mail: sac@bioanalitica.com.br

Revisão: Outubro / 2022.