

DOSAGEM DE CREATININA: FATORES DE ERRO NA REAÇÃO DE JAFFÉ*

Lucia N. CASTILHO**
Mary M. YUKI**
Marina Y. N. ODA**
Heidi P. MARTINS**

RIALA6/650

CASTILHO, L.N.; YUKI, M.M.; ODA, M.Y.N. & MARTINS, H.P. — Dosagem de creatinina: fatores de erro na reação de Jaffé. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48(1/2):93-98, 1988.

RESUMO: Estudamos o mecanismo da reação de Jaffé para a determinação da creatinina humana, utilizando os métodos cinético e ponto-final. Foi analisada a magnitude de interferência nas constantes físicas (tempo e temperatura de incubação) e no equilíbrio da reação, obtendo-se valores subestimados a 25°C nos 2 métodos estudados. Os resultados a 30°C são coerentes com os valores de referência descritos na literatura. A hiperglicemia interfere mais significativamente na reação de ponto-final, elevando os resultados de creatinina a partir de 290 mg%. O método cinético mostrou-se bastante eficaz na dosagem da creatinina sérica discriminando valores sem interferência de substâncias redutoras e com reprodutibilidade compatível às melhores técnicas laboratoriais.

DESCRITORES: creatinina no soro humano, dosagem; Reação de Jaffé; método cinético; método de ponto-final; interferentes.

INTRODUÇÃO

As determinações da creatinina sérica são frequentemente usadas para a avaliação do progresso das doenças renais. Esta dosagem fornece um melhor índice da função renal em relação à uréia, visto que é pouco afetada pela dieta, taxa metabólica e volume urinário²⁰.

A quantificação da creatinina “verdadeira” no soro permanece problemática desde a sua introdução pela reação colorimétrica de Jaffé com picrato alcalino até o presente momento. O princípio desta reação é a formação de um cromógeno alaranjado de picrato alcalino e creatinina denominado complexo de Janovsky². Sabe-se que vários compostos, tais como as cetonas, demonstram uma alta reatividade com o picrato⁹. Para tentar isolar a creatinina dos interferentes cromógenos foram

desenvolvidas várias técnicas, tais como: adsorção¹⁴, hidrólise enzimática¹³, oxidação⁸, extração¹⁷, acidificação secundária⁴, diálise¹⁶ e mais recentemente reações cinéticas¹¹ e cromatografia líquida de alta resolução¹⁵.

Outros problemas que também afetam a dosagem de creatinina são o tempo e a temperatura de incubação¹¹, assim como a concentração do ácido pícrico e a alcalinidade do tampão²⁰.

Constatamos em nossa rotina que a variação da temperatura ambiente estava relacionada com a flutuação dos resultados de creatinina sérica.

Observamos, também, que amostras de soro apresentando valores de creatinina alterados eram, geralmente, de pacientes hiperglicêmicos.

** Trabalho realizado na Seção de Análises Clínicas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

A partir desses achados, propusemo-nos a avaliar a influência dos interferentes exógenos (temperatura) e endógenos (glicose) sobre a quantificação da creatinina sérica, realizando um estudo comparativo dos métodos cinético e de ponto-final, ambos baseados na reação de Jaffé.

MATERIAL E MÉTODOS.

Foi utilizado um "pool" de soros com nível de creatinina normal, provenientes de Centros de Saúde de São Paulo. As dosagens foram executadas através da reação de Jaffé, empregando-se o método de ponto-final¹² e o cinético^{1,10}.

No método de ponto-final utilizamos o ácido picrico (9,19 g/l) como desproteinizante e o sobrenadante foi alcalinizado com tampão glicina-soda (1,88g/4g qsp 100ml, pH 12,4), sendo as leituras realizadas a 510 nm, após incubação por 20 minutos a 30°C. No método cinético empregamos o ácido picrico 1,7g/l e NaOH 0,5N, executando leituras espectrofotométricas a 492 nm, incubando-se por 2 minutos a 30°C.

Para se verificar a linearidade e a reprodutibilidade foram feitas curvas de calibração a 30°C para os 2 métodos, com padrões de creatinina (Merck, PA) cujas concentrações variaram de 2 a 10 mg%.

Neste estudo avaliamos o efeito causado na reação por variações de temperatura e concentrações de glicose (hiperglicemias) na determinação da creatinina sérica.

a) Efeito da temperatura

As dosagens de creatinina foram feitas pelos dois métodos acima citados em temperaturas de 25/30°C, utilizando um n = 108 para o método de ponto-final e um n = 20 para o cinético (Tabela 1).

b) Efeito da hiperglicemia

Para avaliarmos a interferência da glicose na reação de Jaffé adicionamos ao "pool" de soro quantidades crescentes de glicose (Merck, PA) suficientes para obtermos níveis "séricos" de 190 a 495 mg%. Os métodos de ponto-final e cinético, neste caso, foram padronizados a 30°C, sendo o n = 26 para cada concentração de glicose (Tabela 2), totalizando 312 determinações. A análise do próprio "pool" de soros normais foi feita para controle.

As leituras espectrofotométricas da creatinina foram realizadas no Spectronic 21 (Bausch-Lomb) com termostatização das cuvetas. A glicemia foi determinada pelo método U.V. da hexoquinase (Abbott Labs) no ABA 100 em 340 nm, cuja faixa normal é de 76 a 115 mg%.

A análise estatística dos resultados obtidos foi processada em um Microcomputador PC XT (Prologica SP16 286) através do programa IBM Compatível "Statigraphics" versão 1.0, n° de série 378918. A comparação dos parâmetros estudados (temperatura e hiperglicemia) foi feita pelo teste "t" de Student, fixando-se o nível de significância em 5%.

RESULTADOS

Na figura 1 apresentamos as curvas de calibração para os métodos de ponto-final e cinético. No método de ponto-final obtivemos a seguinte equação: $y = 0,101x + 0,009$ e um coeficiente de correlação de 0,98. Para a curva de calibração do método cinético obtivemos a equação: $y = 0,06x + 0,004$ e um coeficiente de correlação de 0,99.

Na tabela 1 apresentamos os resultados de creatinina sérica pelos métodos de ponto-final e cinético a 25 e 30°C, expressos em mg% (os valores são representados por média \pm dp).

TABELA 1

Valores de creatinina obtidos pelos métodos analíticos de ponto final e cinético, em pool de soros

Método	Temperatura	
	25°C	30°C
Ponto final (mg%) (n = 108)	0,65 \pm 0,21	0,90 \pm 0,22*
Cinético (mg%) (n = 20)	0,62 \pm 0,05	0,84 \pm 0,07*

* $p < 0,05$ 25°C X 30°C

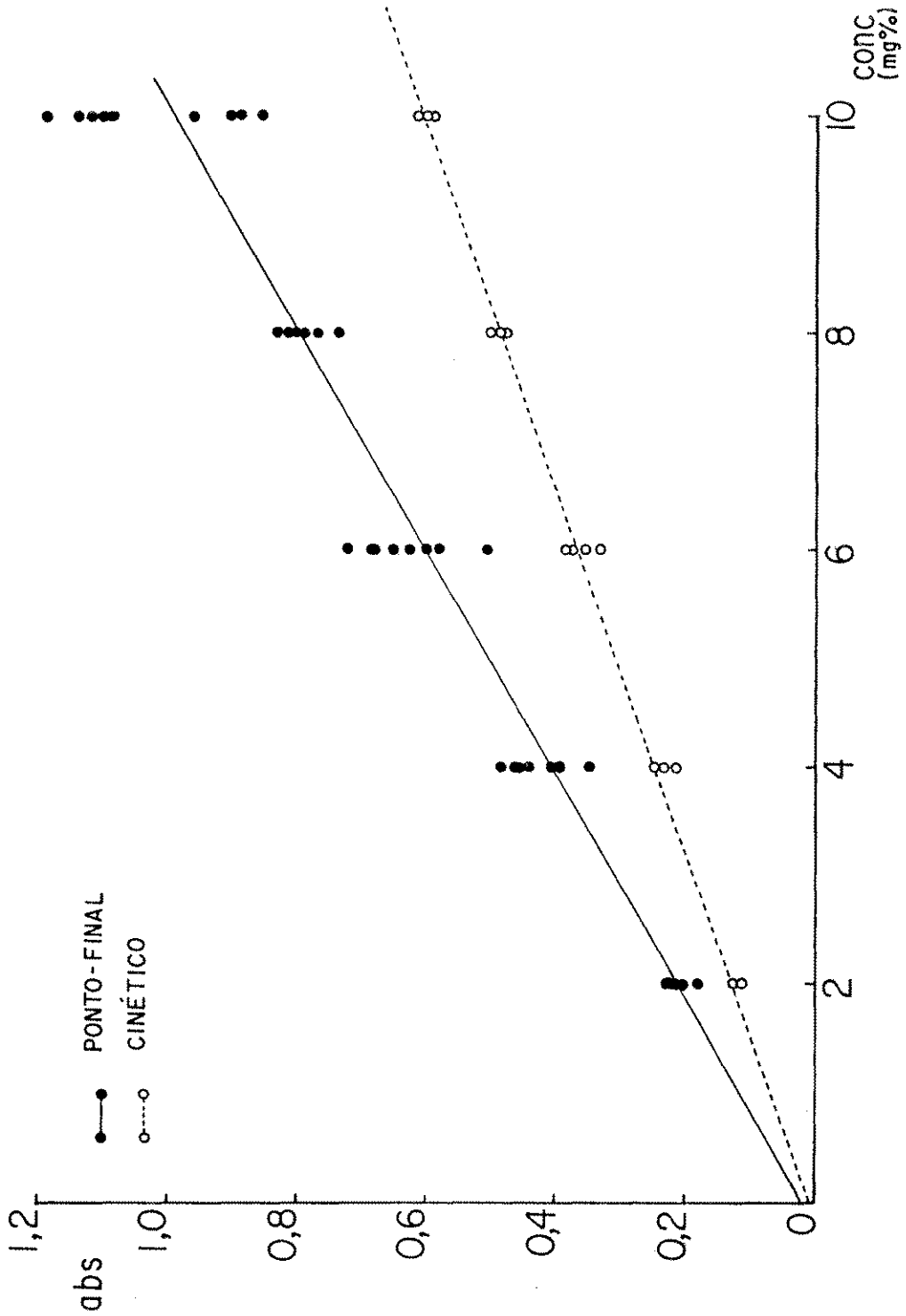


FIGURA 1 — Curvas de calibração (concentração X absorbância) dos métodos de ponto-final (n = 50) e cinético (n = 25), a 30°C.

TABELA 2

Resultados de creatinina obtidos pelos métodos de ponto final e cinético, em pool de soros, acrescidos de quantidades conhecidas de glicose

Método	Conc. glicose	HG				
	C	290 mg%	323 mg%	390 mg%	450 mg%	495 mg%
Ponto-final	0,84±0,14	1,10±0,15*	1,07±0,08*	1,19±0,13*	1,33±0,13*	1,46±0,26*
Cinético	0,86±0,06	0,85±0,05	0,83±0,06	0,83±0,06	0,85±0,05	0,95±0,05*

C = Controle

HG = Hiperglicêmicos

* $p < 0,05$ C X HG

Observamos que existe diferença significativa entre as dosagens realizadas a 25 e 30°C nos dois métodos empregados.

Em relação a interferência de níveis elevados de glicose na creatinina sérica obtivemos os resultados apresentados na tabela 2, expressos em mg% (os valores representam média ± dp).

Podemos observar que o método de ponto-final apresenta resultados significativamente mais elevados, já na concentração de 290 mg% de glicose. Por outro lado, no método cinético, verificamos não haver interferência da hiperglicemia nos resultados obtidos, a não ser em concentração igual ou superior a 495 mg%.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Atualmente, vários autores têm enumerado as vantagens decorrentes da utilização da cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e da espectrometria de massa que aliam a precisão à sensibilidade, uma vez que evitam a influência dos interferentes químicos.

Apesar da eficiência dessas metodologias, elas não são facilmente aplicáveis em laboratórios de análises clínicas, onde se prefere empregar as técnicas bioquímicas de ponto-final e cinética, cujas vantagens são o manuseio simples e o baixo custo operacional.

A reação de Jaffé não é específica para creatinina. Todos os compostos que possuem grupamentos cetônicos (grupo carbonila) reagem com o ácido picrico em pH alcalino, formando um componente cuja complexidade molecular ainda não está elucidada. GREENWALD & GROSS³ sugeriram um tautômero de creatinina-picrato sem especificar

uma estrutura exata. Em estudos mais recentes, BUTLER² e VASILIADES¹⁸ sugerem a formação de um composto constituído por 2 moléculas de creatinina para uma de ácido picrico ou 1 molécula de creatinina para 1 de ácido picrico (complexo de Janovsky).

A temperatura de incubação também é fator importante, pois abaixo de 25° e acima de 30°C os resultados apresentam-se sub ou superestimados, respectivamente.

Nossos resultados demonstraram existir alterações significativas na quantificação da creatinina a 25 e a 30°C. Para cada grau de variação da temperatura, observamos uma diferença de 5,6% no método de ponto-final e de 5,2% no cinético, considerando-se que esta reação apresenta linearidade até 10 mg% (Lei de Lambert-Beer).

LUSTGARTEN & WENK¹¹ verificaram uma diferença de 3% na determinação da creatinina para cada grau de variação da temperatura, sugerindo que este parâmetro não foi crítico para o método cinético. Porém, estes autores não analisaram estatisticamente os seus resultados.

Os valores de referência descritos na literatura para a creatinina sérica situam-se na faixa de 0,8 a 1,1 mg%⁵.

Em nosso trabalho notamos que a 30°C, tanto no método de ponto-final como no cinético, os resultados obtidos estão incluídos no intervalo acima citado.

Por esta razão, as curvas de calibração e o estudo do efeito da hiperglicemia na dosagem da creatinina sérica, pelos 2 métodos, foram padronizados a 30°C.

A perfeita correlação verificada em ambas as curvas de calibração demonstra que os 2 métodos possuem linearidade até 10 mg%, existindo uma menor dispersão dos valores na reação cinética, não havendo portanto, necessidade de um número muito elevado de dosagens.

A presença de outros redutores existentes normalmente no soro humano (oses, uréia, etc.), também interfere no desenvolvimento da cor da reação (pigmento alaranjado) originando resultados falsamente altos¹¹. Por outro lado, quando o soro se apresenta icterício, os valores de creatinina são **superestimados**^{6,7,19}.

Em nosso estudo, verificamos que a hiperglicemia de 290 mg% já interfere na quantificação da creatinina pelo método de ponto-final.

No método cinético não obtivemos nenhuma alteração nos níveis séricos de creatinina na faixa de 290 a 450 mg% de glicose, observando apenas uma superestimação em soros com glicemia de 495 mg%.

É provável que esta interferência da glicose na reação colorimétrica de ponto-final ocorra devido, não apenas a sua permanência no sobrenadante, como também ao longo tempo de incubação que permite a sua oxidação.

Já o método cinético, apesar de utilizar os mesmos reagentes, apresenta a vantagem de um tempo reduzido de análise, evitando, assim, a oxidação de **outras substâncias além da creatinina**. Desta forma, o método cinético mostrou-se bastante útil para discriminar se os valores elevados de creatinina sérica, encontrados em indivíduos diabéticos, são resultantes da interferência da hiperglicemia ou se são conseqüentes às lesões renais desses pacientes.

Portanto, podemos concluir que: 1) há necessidade do controle minucioso dos vários parâmetros que alteram a quantificação da creatinina sérica, quando optamos pela reação de Jaffé; 2) o método cinético é mais adequado para a rotina de nosso laboratório, uma vez que minimiza a interferência dos fatores endógeno e exógeno estudados.

RIALA6/650

CASTILHO, L.N.; YUKI, M.M.; ODA, M.Y.N. & MARTINS, H.P. — Creatinine Dosage: Error Factors in the Jaffé Reaction, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 48(1/2):93-98, 1988.

ABSTRACT: We investigated the mechanism of the Jaffé reaction for the determination of creatinine by studying the kinetic and end-point reactions. The magnitude of interference of the physical constants (time and temperature) and the hyperglycemia in the equilibrium of the reaction has been studied besides the consequent shifts in its spectrum, showing a maximum absorbance at 490 nm.

DESCRIPTORS: creatinine in human serum, dosage; Jaffé reaction; kinetic method; end-point method; interferents.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARTELS, H.; BÖHMER, M. & HEIERLI, C. Serum kreatininbestimmung ohne enteissen. *Clin. Chim. Acta* 37:193-197, 1972.
2. BUTLER, A.R. The Jaffe reaction: identification of the coloured species. *Clin. Chim. Acta*, 59:227-232, 1975.
3. GREENWALD, I. & GROSS, J. The chemistry of Jaffe's reaction for creatinine, a red tautomer of creatinine picrate. *J. Biol. Chem.*, 59:601-612, 1924.
4. HEINÉGARD, D. & TIDERSTRÖM, G. Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta*, 43:305-310, 1973.
5. HENRY, R.J.; CANNON, D.C. & WINKELMAN, J.W. *Clinical Chemistry — Principles and Techniques*. 2nd ed. Maryland, Harpes & Row, 1974. p.550.
6. KIRKPATRICK, M.; MOODY, C.; BATES, D.A. & SHAFFAR, M. Faster creatinine assay in the Abbott Spectrum System. *Clin. Chem.*, 33(8):1466-1467, 1987.
7. KNAPP, M.L. & MAYNE, P.D. Development of an automated kinetic Jaffé method designed to minimize bilirubin interference in plasma creatinine assays. *Clin. Chim. Acta*, 168:239-246, 1987.
8. KOSTIR, J.V. & SONKA, J. Creatinine estimation in blood serum: new method. *Biochim. Biophys. Acta*, 8:86-89, 1952.

9. KROLL, M.H.; ROACH, N.A.; POE, B. & ELIN, R.J. Mechanism of interference with the Jaffé reaction for creatinine. *Clin. Chem.*, 33(7):1129-1132, 1987.
10. LARSEN, K. Creatinine assay by a reaction-kinetic principle. *Clin. Chim. Acta*, 41:209-217, 1972.
11. LUSTGARTEN, J.A. & WENK, R.E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. *Clin. Chem.*, 18:1419-1422, 1972.
12. MARTINEZ, E. & DOOLAN, P.D. Determination of creatinine in small quantities of plasma. Observations on two methods. *Clin. Chem.*, 6:233-242, 1960.
13. MCLEAN, M.H.; GALLWAS, J. & HENDRIXSON, M. Evaluation of an automated creatinase creatinine procedure. *Clin. Chem.*, 19:623-625, 1973.
14. MITCHELL, R.J. Improved method for specific determination of creatinine in serum and urine. *Clin. Chem.*, 19:408-410, 1973.
15. PATEL, C.P. & GEORGE, R.C. Liquid chromatographic determination of creatinine in serum and urine. *Anal. Chem.*, 53:734-735, 1981.
16. RAPOPORT, A. & MUSDAN, H. Endogenous creatinine clearance and serum creatinine in the clinical assessment of kidney function. *Can. med. Assoc. J.*, 99:149-156, 1968.
17. TAUSSKY, H. A procedure increasing the specificity of the Jaffé reaction for determination of creatinine in urine and plasma. *Clin. Chim. Acta*, 1:210-224, 1956.
18. VASILIADES, J. Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: I. Kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex. *Clin. Chem.*, 22(10):1664-1671, 1976.
19. WATKINS, R.E.; FELDKAMP, C.S.; THIBERT, R.J. & ZAK, B. Interesting interferences in a direct serum creatinine reaction. *Microchem. J.*, 21:370-384, 1976.
20. YATZIDIS, H. New method for direct determination of "true" creatinine. *Clin. Chem.*, 20(9):1131-1134, 1974.

Recebido para publicação em 2 de novembro de 1988.