

2. Ej. No 72



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EVALUACION DE TRES METODOS PARA LA CUANTIFICACION
DE CREATININA EN SUERO Y ORINA, UTILIZANDO
LA REACCION DE JAFFE.**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

p r e s e n t a

LEONOR MEJIA ELIAS



1 9 8 4



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**EVALUACION DE TRES METODOS PARA LA CUANTIFICACION
DE CREATININA EN SUERO Y ORINA, UTILIZANDO
LA REACCION DE " JAFFE " .**

CAPITULO I .- INTRODUCCION

CAPITULO II .- GENERALIDADES

CAPITULO III.- PARTE EXPERIMENTAL

a) .- MATERIAL Y METODOS

1.- Método de " Bonsnes y Taussky "

2.- Método de " Owen "

3.- Método Cinético " Larsen "

b) .- EVALUACION DE METODOS CINETICOS

c) .- ADAPTACION DE UN METODO CINETICO MANUAL

CAPITULO IV .- RESULTADOS

CAPITULO V .- DISCUSION

CAPITULO VI .- CONCLUSIONES

CAPITULO VII.- RESUMEN .

C A P I T U L O I

I N T R O D U C C I O N .

Uno de los problemas que desde hace tiempo se ha venido observando en el laboratorio clínico, es la falta de especificidad en los métodos que utilizan la reacción de Jaffé para la determinación de creatinina en suero y orina, ya que ésta reacción se basa en la formación de un compuesto color amarillo naranja-- por la reacción entre la creatinina y el picrato alcalino. La estructura de éste compuesto no ha sido comprobada, pero se estudiarán las propuestas por Greenwald (8) y por Janovsky (32).

El inconveniente es que durante el tiempo de reacción-- intervienen cromógenos no específicos (acetona, ácido diacético-- acetaldehído, dihidroxiacetona, ácido pirúvico etc.) dando valores elevados (21). Además se necesita un volumen de muestra relativamente importante del orden de 1.0 a 3.0 ml. de suero, lo cuál es un grave inconveniente sobre todo en pacientes con dificultad de extracción sanguínea, ya sean adultos con enfermedad renal crónica o infantes en los que los exámenes de laboratorio son numerosos.

Debido a que la determinación de creatinina ocupa un lugar importante en la exploración renal por ser un parámetro-- fisiológicamente estable (11), se decidió estudiar un método -- que disminuya al máximo posible los inconvenientes antes mencio nados.

Así se revisarán y evaluarán tres métodos ya estableci dos para la determinación de creatinina en suero y orina como - es el de " Bonsnes y Tausky " (colorimétrico de punto final), el de " Owen " (adsorción con silicato de aluminio) y el de-- " Larsen " (cinético). Este último se revisará con mayor dete nimiento y en base a su fundamento se ensayarán diferentes modi ficaciones, hasta adaptar un método cinético manual simplifica do que posiblemente presente ventajas sobre los dos anteriores.

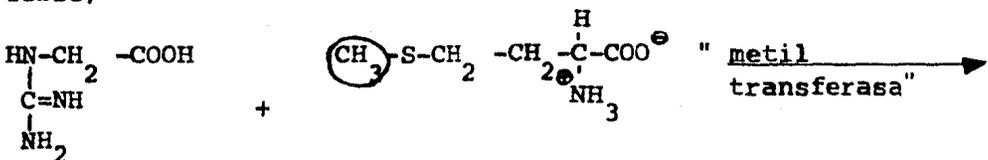
Se analizarán y compararán muestras problema de suero- y orina por los tres métodos, para observar las ventajas y des- ventajas de cada uno, haciendo una evaluación estadística de -- los resultados.

C. A P I T U L O II

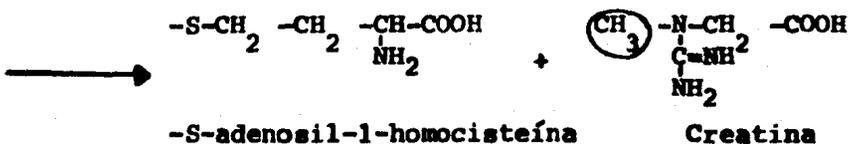
G. E N E R A L I D A D E S.

1905 y 1915, en donde los métodos para cuantificación de creatinina en líquidos y tejidos fueron valiosos.

En 1927, Fiske y Subarrow demostraron que existe ácido-creatinfosfórico en el tejido muscular de los mamíferos, que se desdobra en la contracción muscular y se resintetiza durante la relajación. En 1941 Vigneaud y colaboradores objetivaron la formación de creatina y creatinina exponiendo un nuevo concepto; "la transmetilación es un proceso metabólico generalizado". Utilizando metionina en la que el grupo metilo era isotópico, pudieron demostrar experimentalmente que la metionina era una fuente de grupos metilo de la creatina aislada de los tejidos de animales que recibieron la metionina isotópica, coincidía en su contenido isotópico con el de la creatinina de la orina y así demostraron que el camino hacia la creatina de un grupo metilo determinado se efectuaba en forma más directa desde la metionina que desde otros compuestos estructuralmente afines con la metionina y establecieron que la metilación del ácido guanidoacético es irreversible;

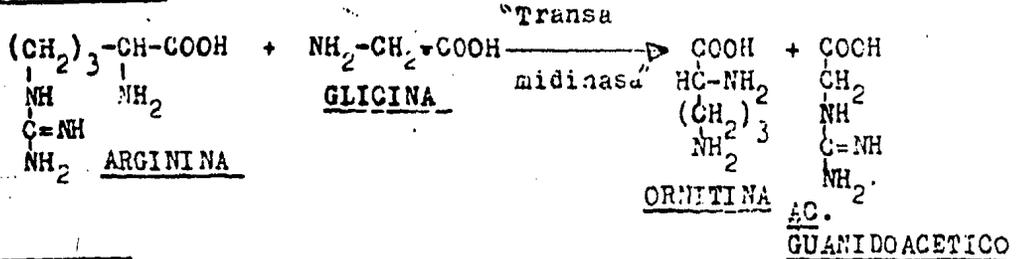


Ac. guanidoacético -S-adenosil-L-metionina

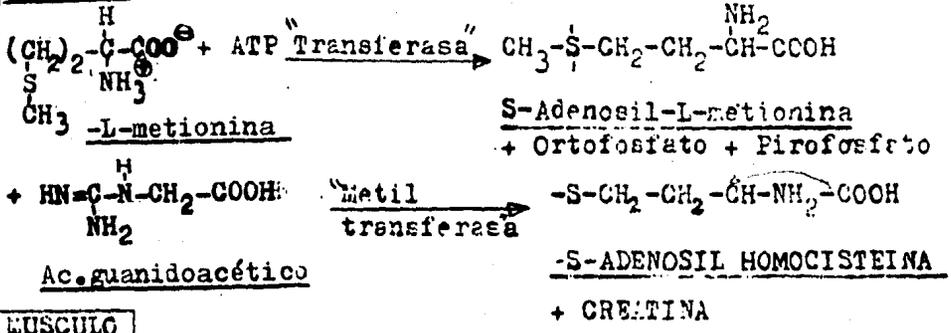


**SINTESIS BIOLOGICA DE LA CREATININA
Y SUS INTERRELACIONES METABOLICAS**

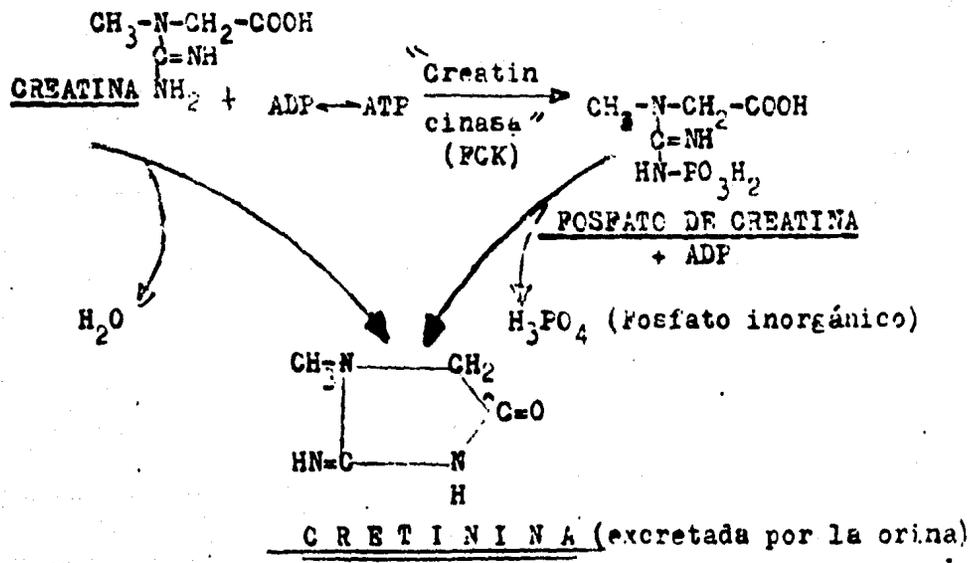
EN RINON



HIGADO



MUSCULO



El grupo metilo de la creatina es estable y no puede cederse en el organismo.

Hobermen en 1947, demostró que el ácido guanidoacético precursor fisiológico de la creatina, existe normalmente en el suero sanguíneo.(27)

En 1949, Du Vigneaud y colaboradores observaron en la rata, que el grupo metilo isotópico administrado con la metionina, la cuarta parte del elemento marcado aparecía en el anhídrido carbónico espirado y la mitad era excretada en la orina y -- las heces. Por consiguiente llegaron a la conclusión de que la -- transmetilación para formar creatina, era un proceso mas activo que la incorporación de metilos en las proteínas totales del -- organismo.

El grupo metilo de la metionina, puede liberarse para lograr la metilación del ácido guanidoacético que se convierte en creatina formándose homocisteína que puede aceptar un metilo de la colina y transformarse en metionina que puede volver a ceder su grupo metilo.

La formación de creatina y creatinina en el organismo normal se cumple através de procesos enzimáticos en los tejidos.

Investigaciones " in vitro " para establecer el lugar de formación de la creatinina, indican que ocurre en músculo esquelético, hígado, riñón y en general en todos los tejidos.(26)

La síntesis de creatinina a partir de glicina y otros-

dos aminoácidos (arginina y metionina), es un proceso en el -- que hay dos pasos enzimáticos.

El acetato de guanidina (glucosiamina o ácido guanidoacético) se forma por la transamidinación fundamentalmente en los riñones y ésta es una reacción reversible mediada por la transamidinasa que está sujeta a una realimentación de la creatina de la dieta. La glucosiamina es entonces metilada en una segunda reacción en la que interviene una transmetilasa y la metionina activada en el hígado para formar creatina.

La creatina en forma libre y como fosfocreatina, se -- distribuye del hígado a través de la sangre al músculo y cerebro con solo trazas de ella en la orina.

La fosfocreatina existe en grandes concentraciones especialmente en el músculo donde es una forma importante de depósito de fosfato de alta energía.

La pérdida espontánea de ácido fosfórico a partir de fosfocreatina en el músculo en condiciones normales con el anillo cerrado, es la mayor reacción que produce creatinina; la -- reacción más lenta no enzimática, consiste en la pérdida de -- agua a partir de la creatina, así la creatinina es el anhídrido de la creatina. También se forma creatinina a nivel muscular(10)

Excreción renal;

La creatinina libre que aparece en la sangre y orina, -- no vuelve a ser utilizada y se excreta por la orina de manera --

constante (mujeres de 0.6 a 1.5 g/24 hrs., y hombres de 1 a 2-g/24 hrs.) (De 5.30 a 13.27 y de 8.8 a 17.6 mmol/Kg. de peso en 24 hrs., respectivamente) (28) .

En 1929, Rehberg sugirió que la creatinina era filtrada a través de los glomérulos y concentrada en los túbulos no--siendo reabsorbida ni aumentada por secreción. Basó su sugerencia en el hecho de que la velocidad entre la concentración de--creatinina en la orina y la del suero, fué mayor que para cualquier otra sustancia biologicamente excretada.

Shannon, ha mostrado que los valores de eliminación de creatinina son semejantes a los de eliminación de sustancias --exógenas como la inulina que es excretada principalmente por --filtración glomerular (y no secretada por los túbulos). El --uso de coeficientes de creatinina que expresan la cantidad de--creatinina en mg/Kg. de peso corporal excretada en 24 hrs., por un individuo sano, está basado en que la cantidad de creatinina en la orina está relacionada con el peso corporal. (31)

Sin embargo se ha observado que la eliminación de creatinina se relaciona mejor con la masa muscular que con el peso corporal ya que se han encontrado coeficientes de creatinina mayores en hombres sanos que en mujeres sanas (33) . Así se explica la razón por la que un individuo obeso generalmente presenta valores de coeficientes de creatinina menores, que un individuo no obeso. (31)

La excreción de creatinina urinaria varía un poco con la cantidad y naturaleza de la dieta y es independiente de la diuresis (31). El ejercicio físico parece incrementarla ligeramente (a diferencia de la urea) (33).

La concentración de urea, ácido úrico y creatinina en la sangre, depende principalmente de la facultad del riñón para excretar dichas sustancias. El riñón normal puede concentrar -- hasta 100 veces su valor en sangre (la urea 80 y el ácido urico 20), por lo tanto el riñón excreta más fácilmente la creatinina.

Cuando la permeabilidad renal disminuye (en insuficiencia renal) la primera sustancia que se retiene es el ácido úrico, aumentando en sangre. En caso de enfermedad renal grave, puede ocurrir que la urea y la creatinina no esten aumentadas -- por la facilidad con que se excretan, pero al aumentar la lesión, se retiene la urea y finalmente la creatinina.

La concentración de creatinina en sangre, es el mejor índice para el pronóstico de una disfunción renal. (31)

Es muy importante que la colección de orina en 24 hrs. sea lo más exacto posible para que la determinación de su contenido de creatinina sea confiable.

Folín, fué uno de los primeros investigadores que utilizó esta prueba y encontró pequeñas variaciones día a día en la cantidad de creatinina excretada en la orina de un individuo sano. Dise-

no una colección completa de orina y notificó que la excreción de creatinina urinaria de 24 hrs., no fué suficientemente constante para ser usada como una prueba de exactitud de la colección de orina de 24 hrs. (27)

Scott y Hurley, en sus estudios con radio isótopos reportan un coeficiente de variación de excreción de creatinina para un solo individuo del 10%, mientras entre diferentes sujetos el promedio fué del 29 %.

Sobre la base de éstos resultados, los autores concluyeron que la concentración de creatinina en orina cuidadosamente colectada en 24 hrs., proporciona sólo una ligera estimación de la cantidad total de dicha concentración de creatinina.

Otros investigadores han reportado el coeficiente de variación para excreciones de creatinina de 24 hrs., entre diferentes sujetos y varía de 4.1 a 28.2 %. Igualmente el volumen de excreción urinaria presenta variaciones hasta del 50%. (25).

Folín reportó un coeficiente de variación de 6.8 % (31)

Puesto que la creatinina no es reabsorbida por los túbulos, los valores de eliminación de creatinina, no son un estimado exacto del grado de filtración glomerular porque pequeñas cantidades de creatinina son secretadas por los túbulos. Consecuentemente los valores de eliminación de creatinina exceden ligeramente los de inulina. Aún así, una medición de eliminación de creatinina endógena ofrece un buen estimado de fun--

ción glomerular.

La eliminación de creatinina (ml/min.), es calculada por la siguiente fórmula;

$$\frac{\text{Concentración en orina}}{\text{Concentración en suero}} \times \text{vol. orina (ml/min.)} \times \frac{1.73}{\text{sup. corporal}}$$

donde 1.73, es la superficie promedio del cuerpo en m².

La superficie del cuerpo aparentemente se relaciona -- con el tamaño de los riñones.

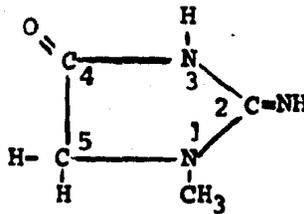
Expresando la eliminación de creatinina en términos de un promedio de superficie corporal, permite la comparación de velocidades de eliminación en individuos con diferentes superficies corporales.

La relación entre la eliminación de creatinina y urea, es aparentemente constante cuando la secreción de orina es normal y es usualmente de 0.6, pero puede variar de 0.4 a 1.1.(31).

Introducción a la metodología:

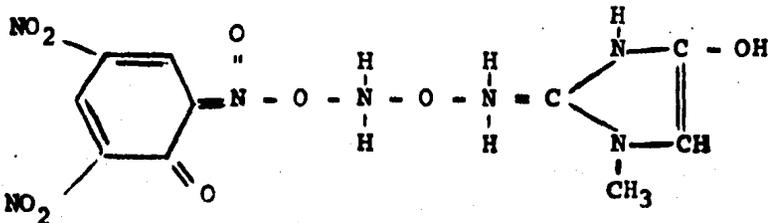
Jaffé estudió la coloración originada por la creatinina con el ácido pícrico en medio alcalino (en 1886) y Folín la aplicó en 1904 para la determinación analítica. (31)

Greenwald, fué el primero en hacer un estudio sistemático de la química de la reacción de Jaffé (16). El atribuyó el color rojo a una sal de creatinina, ácido pícrico e hidróxido de sodio y notó que había por lo menos dos lugares en la molécula de creatinina donde un cambio en un átomo de hidrógeno pudo producir un tautómero; una lactama-lactima se reanega entre -- la posición 3 y 4 o un cambio ceto-enol entre la posición 4 y 5 (17).



CREATININA

Aún cuando la naturaleza del pigmento no se conoce con exactitud, Greenwald le asignó la siguiente estructura; (8)



La dimetilcreatinina, en la cuál un rearrreglo lactama-lactima es imposible por substitución de todos los átomos de hidrógeno atacantes del nitrógeno. (también dan la reacción de Jaffé, aquellos que estan fuera de ésta posibilidad)

Una estructura con tautomería ceto-enol no da la reacción de Jaffé como es la dimetilol creatinina.(6)

Greenwald, notó que éste compuesto no podía formar una sal con ácido pícrico porque la base nitrogenada se combinó con un grupo hidroximetilo. Entonces él concluyó que la molécula debería tener propiedades básicas para dar la reacción de Jaffé. Así Greenwald junto con Gross, estudiaron la futura estructura-- de la molécula de ácido pícrico y concluyeron que los dos grupos nitro en la posición orto o regularmente los tres grupos -- nitro y el hidrógeno en la posición meta, fueron los componentes estructurales responsables de la reacción de Jaffé con creatinina. Ellos basaron ésta conclusión en la observación de que tales análogos de ácido pícrico como 2-4 dinitrofenol ó 2-4-6-- trinitro meta cresol, ninguno cubría los requerimientos mencionados, no dando así la reacción de Jaffé con creatinina.(17)

Archibald, comprobó que a temperaturas inferiores a -- 30^oc, el color se debía a un tautómero de picrato de creatinina, mientras que a temperaturas mayores se origina metil guanidina y picramato por reacción del picrato. (21)

El trabajo de Greenwald, sugiere que el color rojo foz

mado por la reacción de Jaffé, es el resultado de un complejo--
1:1 y 2:1 entre la creatina y ácido pícrico.

En 1936, Bollinger aisló un sólido rojo de la mezcla--
de reacción de Jaffé y lo reportó como un complejo formado de--
un mol de ácido pícrico, un mol de creatinina y dos moles de hi-
dróxido de sodio.

Abe, señaló sin embargo que el propio ácido pícrico --
por sí mismo reacciona con el hidróxido de sodio para producir-
un complejo ión picrato. (3)

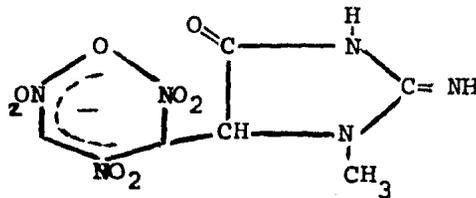
Algunos investigadores han proporcionado evidencias ba-
sadas en estudios espectroscópicos y cromatográficos de que el
color rojo formado por la reacción de Jaffé no es debido al áci-
do picrámico.

Se han reportado dos complejos de ácido pícrico con ig-
nes hidroxilo dependiendo de la concentración de hidróxido de -
sodio usado en la reacción de Jaffé. Estos complejos se presen-
tan en diferente tiempo de la reacción. La forma que prevalece-
a bajas concentraciones de NaOH fué la del 2º complejo. Los --
efectos de la concentración de hidróxido de sodio sobre el pro-
ducto final formado en la reacción de Jaffé, han sido evidencia-
dos por datos espectroscópicos. Incrementando la concentración-
de hidróxido de sodio, se eleva la absorción máxima de los pro-
ductos a mayor longitud de onda.

Estudios en la cinética de la reacción de Jaffé, han--

mostrado que la constante de velocidad de reacción de primer orden es lineal en función a la concentración de hidróxido de sodio. (8).

Butler, ha propuesto que el grupo metileno de creatinina, reacciona con el anión picrato para formar un complejo 1:1- " Janovsky"



Complejo postulado de "Janovsky" para la reacción de "Jaffé".

El producto de la reacción de "Jaffé", podría esperarse que diera picos de absorbancia para protones metilo y metileno de creatinina y el anillo protón de ácido pícrico.

Se han efectuado cuidadosos estudios de resonancia magnética nuclear para la reacción de Jaffé. Los resultados de tales estudios indican que se forma primero un producto 1:1 rojo-naranja de creatinina y ácido pícrico, siendo después lentamente convertido a un compuesto amarillo estable con una cinética de primer orden.

Estudios polarográficos demostraron que cuando concentraciones iguales de creatinina y ácido pícrico se mantienen -- cerca del 10% del producto final, se forma un complejo 2:1 de --

creatinina y picrato.

El mecanismo de la reacción de Jaffé, depende de la --
concentración de hidróxido.

Cuando se usa exceso de ácido pícrico, prevalecen con-
diciones de pseudoprimer orden.

Al aumentar la concentración de hidróxido, se presenta
un cambio de menor absorbancia.

A una mayor longitud de onda, se produce un cambio -
en la máxima absorción del picrato alcalino. Por lo tanto se ob-
serva que es necesario un rígido control en la concentración de
hidróxido de sodio.

Variables involucradas en la reacción de " Jaffé "

El color desarrollado en la reacción de Jaffé, ha sido atribuído a un tautómero de creatinina a temperatura menor de 30°C y un tiempo de reacción no mayor de 15 minutos (4). Un incremento de éstos valores en tiempo y temperatura, producen presumiblemente metilguanidina y picramato. Temperaturas entre 15- y 25°C aparentemente tienen poco efecto sobre el desarrollo de color, sin embargo se ha visto que la temperatura a la cuál es medida la absorbancia influye considerablemente en los resultados.

La absorbancia del blanco de picrato alcalino y la de un problema de picrato de creatinina, aumentan conforme la temperatura aumenta, pero la magnitud del aumento no es la misma para ambos. Sin embargo la absorbancia de una muestra problema que contiene creatinina a aquella de un estandar de creatinina medida a diferentes temperaturas, es constante para ambas. (28')

El efecto de la temperatura sobre la absorbancia en una solución de picrato alcalino, depende de la longitud de onda a la cuál sea medida. Entre 475 y 520 nm, un incremento de temperatura de 25 a 40°C, aumenta la absorbancia. La magnitud del incremento aumenta conforme la longitud de onda decrece de 520 a 475 nm. Así el error que pudo resultar del control impropio de temperatura, es mayor a 490 nm. y es mínimo a 520 nm. (4)

En estudio realizados por Sheshadri Narayanan y Harold D. Appleton, observaron que la diferencia de 1°C en la temperatura produce $0.7 \mu\text{mol/l}$ de error en la concentración de creatinina a 490 nm. y de 10 veces menos a 520 nm. El uso de la longitud de onda intermedia entre 490 y 520 nm. es recomendado para minimizar los efectos de temperatura inducida. (31)

El ácido pícrico; La intensidad de color producida en la reacción de Jaffé, es aparentemente independiente de la concentración de ácido pícrico, sin embargo una alta concentración de dicho ácido realmente disminuye el color de la reacción final.

El hidróxido de sodio; influye también en el desarrollo de color que será mayor a menor concentración de álcali. Así el color producido en la reacción de Jaffé, es inversamente proporcional a la concentración de ácido pícrico y álcali. La absorción máxima para picrato-creatinina-álcali es aproximadamente 485 nm. con blanco de picrato alcalino (6).

Precipitación de proteínas; La recuperación de creatinina en filtrado libre de proteínas, depende del pH del precipitado, ya que a pH menor de 2 con ácido tricloroacético, la recuperación de creatinina es cuantitativa. Sin embargo con filtrado de ácido tungstico en el rango de pH 3 a 4.5 las pérdidas se deben a que la creatinina se adsorbe en el precipitado de proteínas. (28')

pH; La velocidad del desarrollo de color en la reacción de Jaffé, es función del pH. Al disminuir el pH disminuye-

la velocidad del desarrollo de color y difieren el problema de--
picrato de creatinina y el blanco de picrato alcalino. (31)

Importancia clínica en la determinación de creatinina:

Desde 1909, se reconoció que la excreción de creatinina era baja en enfermedad muscular, especialmente en distrofia muscular. (41)

En enfermedad renal los valores de creatinina en suero se incrementan significativamente, hasta que la función renal ha sido considerablemente dañada. La determinación de eliminación de creatinina, puede indicar más sensiblemente daño renal y entonces puede ser usada para seguir el efecto de tratamiento en caso de glomerulonefritis aguda, identificar una disfunción glomerular primaria y para revisar una función renal general, sin embargo permanecen problemas en la especificidad de ésta prueba.

Entonces es difícil determinar que el daño es debido solamente a disfunción glomerular, porque la velocidad de filtración glomerular está decrecida en condiciones que contribuyen al flujo sanguíneo renal disminuido. (10)

El diagnóstico usa los valores de eliminación de creatinina y depende de la estandarización para colección de orina y suero. Un catéter podía ser usado para pacientes con volumen de orina disminuido. Un valor de eliminación de creatinina que es del 20 al 40% de lo normal, indica severa enfermedad renal. De 40 a 60%, moderado daño renal y de 60 a 80%: disfunción renal media- (31).

Debido a que las constantes de velocidad total de eliminación de fármacos y secreción de creatinina están linealmente relacionadas, se puede utilizar los valores de eliminación de creatinina para ajustar la dosis de fármacos en pacientes con disfunción renal.

La eliminación de creatinina y metabolitos específicos, tienen su utilidad diagnóstica como por ejemplo los 11 hidroxicosteroides y la creatinina libre urinaria en muestra de la primer orina de la mañana, han sido utilizados como un índice de la función adrenal ya que sus valores aumentan significativamente en padecimientos como el síndrome de "Cushing" (35).

Estados Fisiológicos:

La eliminación de creatinina decrece con el avance de la edad. En un paciente de 80 años de edad los valores promedio disminuyeron $140\text{ml}/\text{min.} \times 1.73\text{ m}^2$ de superficie corporal.

En el embarazo debido al aumento de filtración glomerular aumenta la eliminación de creatinina en un 50% o más.

La eliminación de la proporción creatinina-amilasa, se usa como indicador de pancreatitis aguda.

En un estudio realizado, 16 de 17 pacientes con pancreatitis aguda tuvieron un incremento significativo de la eliminación de la proporción creatinina/amilasa que permaneció por encima de lo normal que lo que fué la actividad amilasa en suero u orina por separado.(31)

En presencia de riego sanguíneo normal, todo aumento en los valores de creatinina por encima de 2 a 4 mg/dl. sugiere daño renal que puede ser de moderado a serio. Su elevación suele ser pareja con la de la urea aún cuando la creatinina en general resulta más tardía. (27)

Tiene particular interés en el diagnóstico y pronóstico de las siguientes enfermedades;

Nefritis, insuficiencia renal con uremia. En la nefritis aguda por lo general no se advierte elevación, en la nefrosis por tóxicos es donde se observan mayores elevaciones. En las obstrucciones urinarias (afecciones de próstata, vejiga, uréter etc.) y en anuria refleja (litiasis), se producen así mismo -- elevaciones hasta de 30 mg/dl o más, reversibles con la desaparición de la obstrucción.

Existe aumento patológico con la inanición, en miopías, atrofia muscular secundaria y esfuerzos violentos o prolongados y en hiperparatiroidismo. Además luego de la administración de tiroxina, adrenalina, cafeína, narcóticos e intoxicaciones por sulfocianuro, ácido monobromoacético etc. (27) Sin embargo una de las pruebas más sensibles para medir la velocidad de filtración glomerular, es la depuración de creatinina. (20)

En general el grupo de pruebas que se designan como -- pruebas de depuración renal, son un medio útil, eficaz y sensible de medir la capacidad de eliminación del riñón, pues miden la --

cantidad de una sustancia eliminada con la orina, en comparación con la concentración de la misma sustancia en el plasma, siendo más útiles desde el punto de vista clínico que las pruebas que miden la retención de compuestos nitrogenados no protéicos en suero, los cuales no pueden estar en cantidades anormales hasta que no se ha producido disminución importante en la función renal (por debajo del 50% de lo normal). (33)

La cantidad de sustancia depurada por el riñón, se expresa como el volumen de plasma que contiene la cantidad de sustancia eliminada en la orina:

$$\text{ml. de plasma depurado/min.} = \frac{U}{P} \times V$$

U = concentración de sustancia en la orina.

P = concentración de sustancia en la plasma.

V = volumen de la orina / minuto, expresado en ml. (36')

La velocidad de depuración es aproximadamente proporcional al tamaño del riñón y al área de la superficie del cuerpo. La selección del tipo de prueba de depuración que ha de hacerse, se efectúa teniendo en cuenta la información que el médico desee, el modo de eliminación de la sustancia, la seguridad del paciente y la facilidad de determinación cuali y cuantitativa de dicha sustancia. Si va a estudiarse una sola faceta de fisiología renal, habrá de escogerse una sustancia que sea eliminada de manera predominante por los glomérulos, sin ser ni eliminada ni reabsorbida por los túbulos. La inulina es una de-

éstas substancias, sin embargo se emplea rara vez por ser compleja su determinación. La creatinina es una substancia que se comporta de manera análoga a la inulina.

Otra prueba es, la Depuración de urea que fué una de las primeras que se usó, sin embargo los resultados no son una verdadera medida de la velocidad de filtración glomerular sino de la función renal total.

Siendo la creatinina un producto residual derivado, de la creatina (anhidrido de creatina), creatina y creatinina pueden determinarse en cualquier líquido biológico, pero las muestras que se emplean más frecuentemente son suero y orina. (34)

La creatina se determina como la diferencia entre la creatinina preformada y el total que resulta después de haber convertido la creatina presente en creatinina por calentamiento a un pH ácido.

Por lo tanto, una de las pruebas más útiles para determinar la velocidad de filtración glomerular, es la prueba de depuración de creatinina. (32)

La prueba de Depuración de Creatinina:

Es una medida relativamente exacta y útil de la velocidad de filtración glomerular, reemplazando a la prueba menos exacta de depuración de urea, debido a que la creatinina no se reabsorbe por los túbulos y la ingestión de líquidos y su elimi-

nación afectan menos la depuración de creatinina que la de la urea.

También los valores de creatinina en sangre son relativamente más estables por lo que la muestra de sangre puede obtenerse en cualquier momento durante la recolección de orina. Cuando los niveles de creatinina aumentan por encima de lo normal, es secretada también creatinina por los túbulos y así el valor de depuración de creatinina, puede ser mayor que la velocidad de filtración glomerular real. (27)

Si la velocidad de filtración glomerular es el volumen de plasma filtrado por los glomérulos cada minuto, cuando la creatinina plasmática es alta, sea por enfermedad renal, o por administración oral de creatinina, parte de ella es excretada del plasma por los túbulos. Por lo tanto no se pueden comparar las filtraciones glomerulares (basadas en depuración de creatinina) de un paciente con enfermedad renal grave, con los valores normales basados en cifras plasmáticas bajas de creatinina. Sin embargo la depuración de creatinina es un método útil para seguir los progresos de una enfermedad renal evolutiva, siempre y cuando los resultados se interpretan en forma comparativa y no absoluta. (19) El paciente recibe una alimentación sin carne, té ni café durante el período de recolección de la orina que deber ser de 24 hrs. para resultados óptimos y de ninguna manera menor de 8 hrs. El paciente debe seguir tomando agua para asegurar un-

volumen urinario de 1.0 ml. por minuto cuando menos. Se interrumpe toda terapéutica diurética.

La muestra de sangre para medición de creatinina aunque cuando se mencionó anteriormente puede obtenerse en cualquier momento durante la recolección de orina, es más adecuado a la mitad del período de recolección.

Se mide la creatinina total de orina y la de suero, el volumen urinario total y la superficie corporal (valor que se puede obtener mediante la fórmula de Dubois)

$$S = E^{0.725} \times P^{0.425} \times 71.4$$

S = superficie corporal en cm^2 (adulto promedio; 1.73)

E = estatura en cm.

P = peso en Kg.

Así la depuración de creatinina en ml/min. =

$$\frac{O \cdot V}{P} \times \frac{1.73}{S}$$

Donde: O = creatinina urinaria en mg/dl

V = volumen urinario en ml/min.

P = creatinina plasmática o sérica en mg/dl.

S = superficie corporal en m^2 (1.73 m^2)

Valores de referencia:

Hombres de 105 +- 20 ml/min.

Mujeres de 95 +- 20 ml/min.

OTROS METODOS:

1.- Métodos que eliminan la técnica de precipitación - de proteínas utilizando suero directo, pero que se ocupa de evitar la interferencia de dichas proteínas ya sea:

a).- Combinandolas con SDS (dodecil sulfato de sodio) para formar complejos muy estables con un gran número de cargas negativas de grupos sulfatos, eliminando el efecto interferente de la bilirrubina (ya que existe precipitación de ésta proteína). Este reactivo junto con Triton X-100, se adiciona a los reactivos utilizados en la técnica de Jaffé.

(5) (18)

b).- Basado en la adsorción de creatinina en resinas de intercambio iónico (Dowex 50 W) y posterior elución de ésta -- con picrato alcalino. (Met. Stoten; (8))

c).- Otro método en el que la creatinina es separada de sustancias interferentes en la reacción de Jaffé, es la cromatografía de intercambio iónico, pero éste procedimiento es - tedioso e inconveniente para análisis de rutina. (47)

d).- El borato es conocido formador de complejos con carbohidratos sobre condiciones alcalinas. Estos complejos serán --- también negativamente cargados como opositores a los carbohidratos neutrales. (20)

2.- Métodos Enzimáticos:

Mc. Lean y Colaboradores (46), han ensamblado dos cromógenos pa-

ra la reacción de " Jaffé" y la previa reacción de la "Creatinasa" que cataliza la transformación de la creatinina en N-metilhidantoína y amoníaco (47). La creatinasa permite así la evaluación de la creatinina con un electrodo de amoníaco (48) La "Creatinaminohidrolasa" transforma la creatinina en creatina y permite determinar la creatinina debido a la serie de reacciones acopladas conducentes a la oxidación del NADH (50)

3.- Prueba de la tira reactiva:

Comercializada por labs. " Ames" existe en el comercio como -- prueba cuantitativa para creatinina en suero en Tira reactiva-- Seralyzer y consiste en una área reactiva adherida en una tira de plástico. Cuando se utiliza con el reflectómetro Seralyzer, - el sistema proporciona una lectura directa. El método utilizado está basado en la reacción de Benedict (44) en la cuál la creatinina reacciona con el ac. 3,5-dinitrobenzónico en una medio alcalino para formar un complejo de color púrpura. La concentración es cuantificada a partir de una curva de calibración que-- se genera utilizando los calibradores de creatinina.

REACTIVOS:

Hidróxido de potasio	43.6 %
Ac. 3.5- dinitrobenzónico	55.8 %
Ingredientes no reactivos	0.6 %

TECNICA:

Una cantidad medida de suero no diluído, se pipetea so

bre el área reactiva de la tira. Durante la incubación de 30 segundos, se mide el cambio de la reflexión con el Seralyzer a -- 560 nm.

Los resultados obtenidos por éste método , reportan -- buena precisión, correlación y linealidad entre 0 y 15 mg/dl.

Valores de referencia:

Varones : 0.6 a 1.2 mg/dl

Mujeres: 0.5 a 1.0 mg/dl. (45)

Reacción con 3,5-dinitrobenzónico:

La creatinina reacciona con Ac. 3,5-dinitrobenzónico en un pH alcalino para dar un color púrpura rosa, pero el color no es muy-- estable.

Reacción colorida de Sakaguchi:

Reacción de creatinina con o-nitrobenzaldehído que en presencia de álcali forma oxalilmetilguanidina que es convertida en metilguanidina por calentamiento después de la neutralización dando-- un color rojo de guanidinas monosustituídas con alfa naftol timina, hidróxido, tiosulfato e hipoclorito de sodio(103).

Esta reacción presumiblemente no mide los cromógenos -- inespecíficos encontrados en la reacción de Jaffé.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

a) .- MATERIAL Y METODOS.

1.- Método de punto final " Bonsnes y Taussky"

2.- Método de adsorción " Owen"

3.- Método Cinético " Larsen"

b) .- EVALUACION DE METODOS CINETICOS

c) .- ADAPTACION DE UN METODO CINETICO MANUAL.

1.- Método de " Bonnes y Tausky "

(modificación de " Folín Wu" (6).

FUNDAMENTO.- El suero se diluye con agua destilada y ácido sulfúrico precipitándose las proteínas con ácido tungstico. Al filtrado de Folín Wu libre de proteínas se añade picrato alcalino con el cuál la creatinina forma un complejo amarillo-naranja (reacción de Jaffé) cuya absorción es proporcional a la cantidad de creatinina presente en el filtrado.

MUESTRA.- Puede determinarse en cualquier líquido biológico, pero las muestras que se emplean más comunmente son plasma, suero y orina.

Si la determinación no se efectúa inmediatamente, la muestra debe congelarse.

REACTIVOS:

H ₂ SO ₄	2/3 N.
Na OH	0.75 N.
Tungstato de sodio al	10 %
Ac. pícrico	0.04 M.
Sol. estandar de creatinina	1 mg/dl.

Filtrado de Folin Wu:

Suero	1 ml
H ₂ O destilada	7 ml
H ₂ SO ₄ 2/3 N	1 ml
Tungstato de sodio al 10 %	1 ml ^{agitar}
Reposar 5 minutos, filtrar	^{agitar}

TECNICA:

	P	St	B
Filtrado de Folin	3.0 ml.	-----	-----
Estandar de creatinina	-----	3.0 ml	-----
Agua destilada	-----	-----	3.0 ml
Ac. pícrico 0.04 M	1.0ml	1.0ml	1.0 ml
Na OH 0.75 N	1.0ml.	1.0ml	1.0 ml
mezclar, reposar 15 minutos y leer a 520 nm. o filtro 490.			
Nota: la orina se diluye 1: 200			

VALORES DE REFERENCIA : (33)

Plasma o suero	Hombres	Mujeres
	De 0.9 a 1.5 mg/dl ó 79 a 132 μ mol/l	De 0.8 a 1.2 mg/dl 70.7 a 106 μ mol/l
Orina	De 1.0 a 2.0 mg/dl ó 88.5 a 177 mmol/24hrs.	De 0.8 a 1.8g/24hrs. 70.7 a 159mmol/24 hrs.

ESPECTRO DE ABSORCION DE CREATININA

Tec. " Bonsnes y Taussky"

Espectrofotómetro: Hitachi Perkin Elmer.

Absorbancia	Estandar 1 ^o	Suero problema
<u>nm</u>	<u>2.0mg/dl</u>	<u>(2.5 mg/dl)</u>
450	.013	.02
460	.020	.025
470	.030	.037
480	.036	.045
485	.040	.044
486	.038	.045
488	.045	.043
490	.050	.046
492	.040	.043
494	.030	.042
496	.028	.042
498	.030	.040
500	.020	.040
502	.020	.039
504	.019	.038
505		.037

Valores correspondientes a

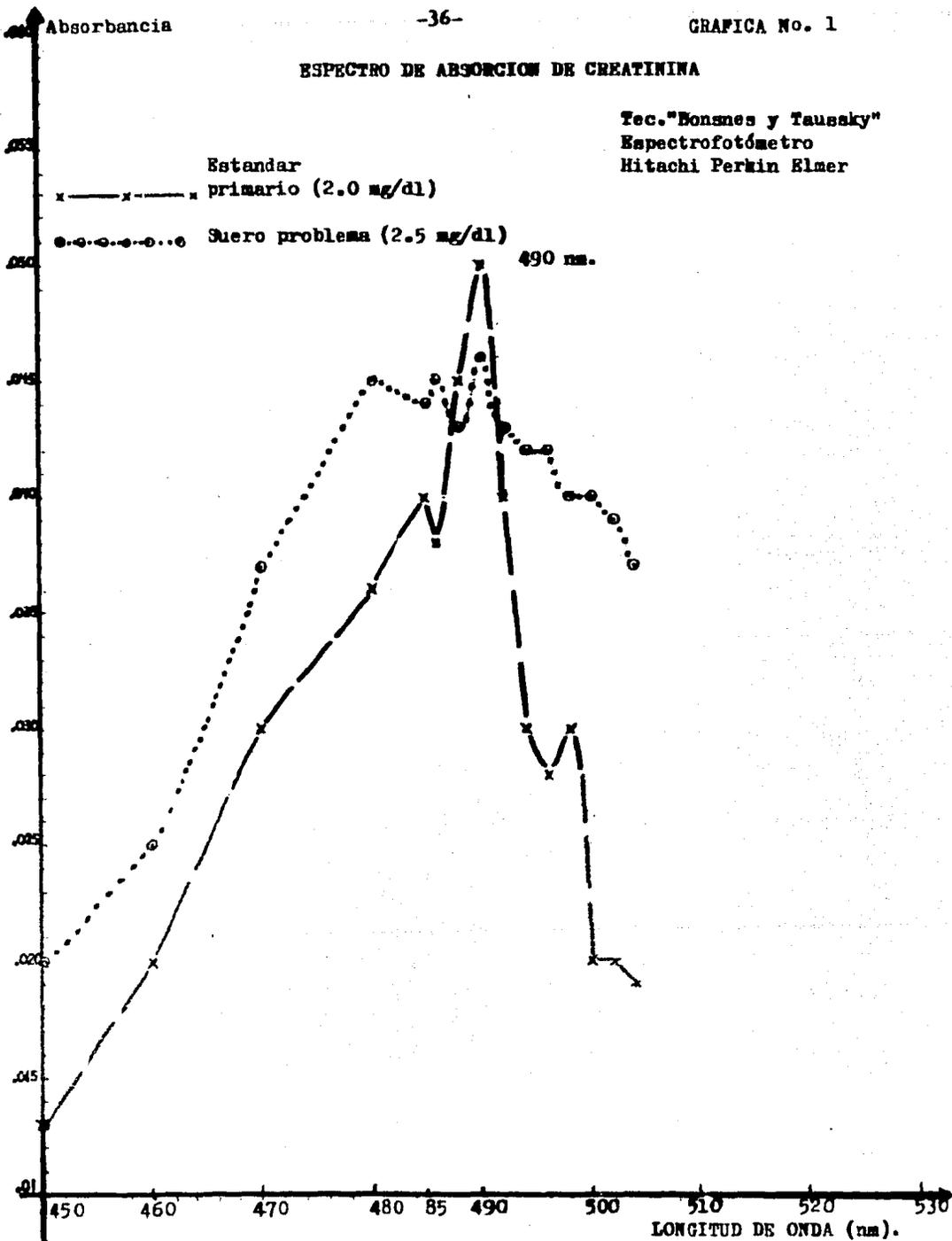
GRAFICA No. 1

Nota:

Se observa que la máxima absorbancia para creatinina es de 490 nm.

ESPECTRO DE ABSORCION DE CREATININA

Tec. "Bonsnes y Tausky"
Espectrofotómetro
Hitachi Perkin Elmer



ESTABILIDAD DE LA REACCION DE JAFFE

Tec. " Bonsnes y Tausky"

Espectrofotómetro, Hitachi Perkin Elmer

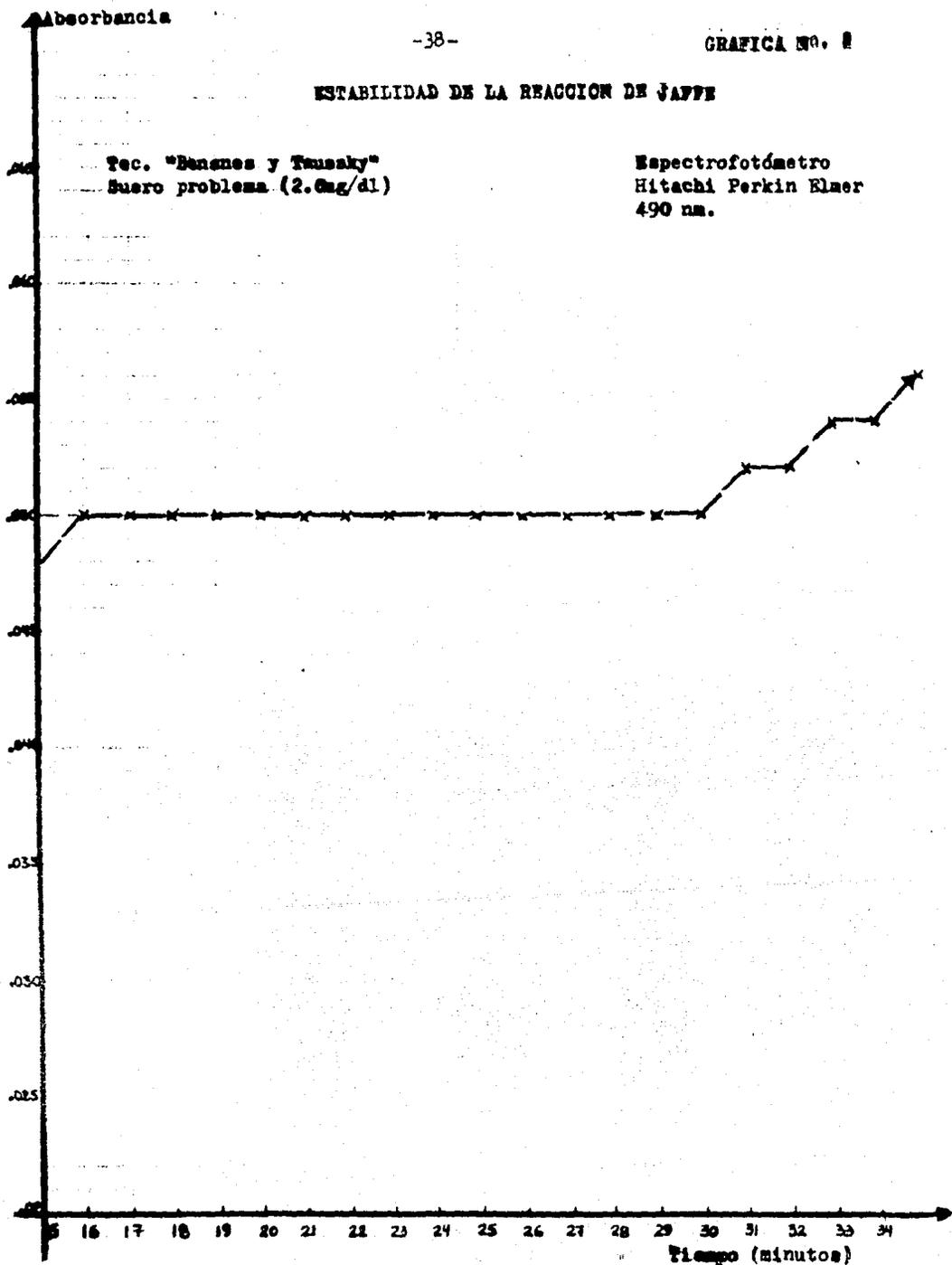
Suero problema (2.0 mg/dl), 490 nm.

<u>TIEMPO (min)</u>	<u>ABSORBANCIA (nm)</u>
15	.050
16	.050
17	.050
18	.050
19	.050
20	.050
21	.050
22	.050
23	.050
24	.050
25	.050
26	.050
27	.050
28	.050
29	.050
30	.050
→ 31	.052 ←
32	.052
33	.053
34	.053
35	.054

Nota:

La lectura en el espectrofotómetro deberá realizarse a los 15 minutos de iniciada la reacción, la cuál permanece estable 15 minutos más, ya que al minuto 31 se nota una elevación por compuestos que no son creatinina como se nota en la gráfica No. 2.

ESTABILIDAD DE LA REACCION DE JAFFE



METODO DE " BONSNES Y TAUSSKY"**CALIBRACION:**

De una solución de creatinina de 1mg/ml, hacer una dilución 1:10 para obtener 0.1 mg/ml.

<u>Sol. de Creatinina</u>	<u>Agua dest.</u>	<u>Creatinina</u>
<u>0.1 mg/ml</u>	<u>c.b.p.</u>	<u>mg/dl</u>
1 ml	100 ml	1
2 ml	100 ml	2
3 ml	100 ml	3
4 ml	100 ml	4
5 ml	100 ml	5
6 ml	100 ml	6

ENSAYO DEL METODO DE "Bonnes y Tausky"
para determinación de CREATININA.

Espectrofotometro
 Hitachi Perkin Elmer

490 nm.

CALIBRACION:

	<u>Estandar 1^o</u> <u>creatinina</u> <u>mg/dl</u>	<u>\bar{x} de 3 ensayos</u> <u>absorbancia.</u>
	1	.025
	2	.055
	3	.090
	4	.120
Valores	5	.155
correspondientes	6	.175
a GRAFICA No. 3	7	.210
	8	.250
	9	.280
	14	.430
	16	.500
	18	.560
(Suero control)	4	.125

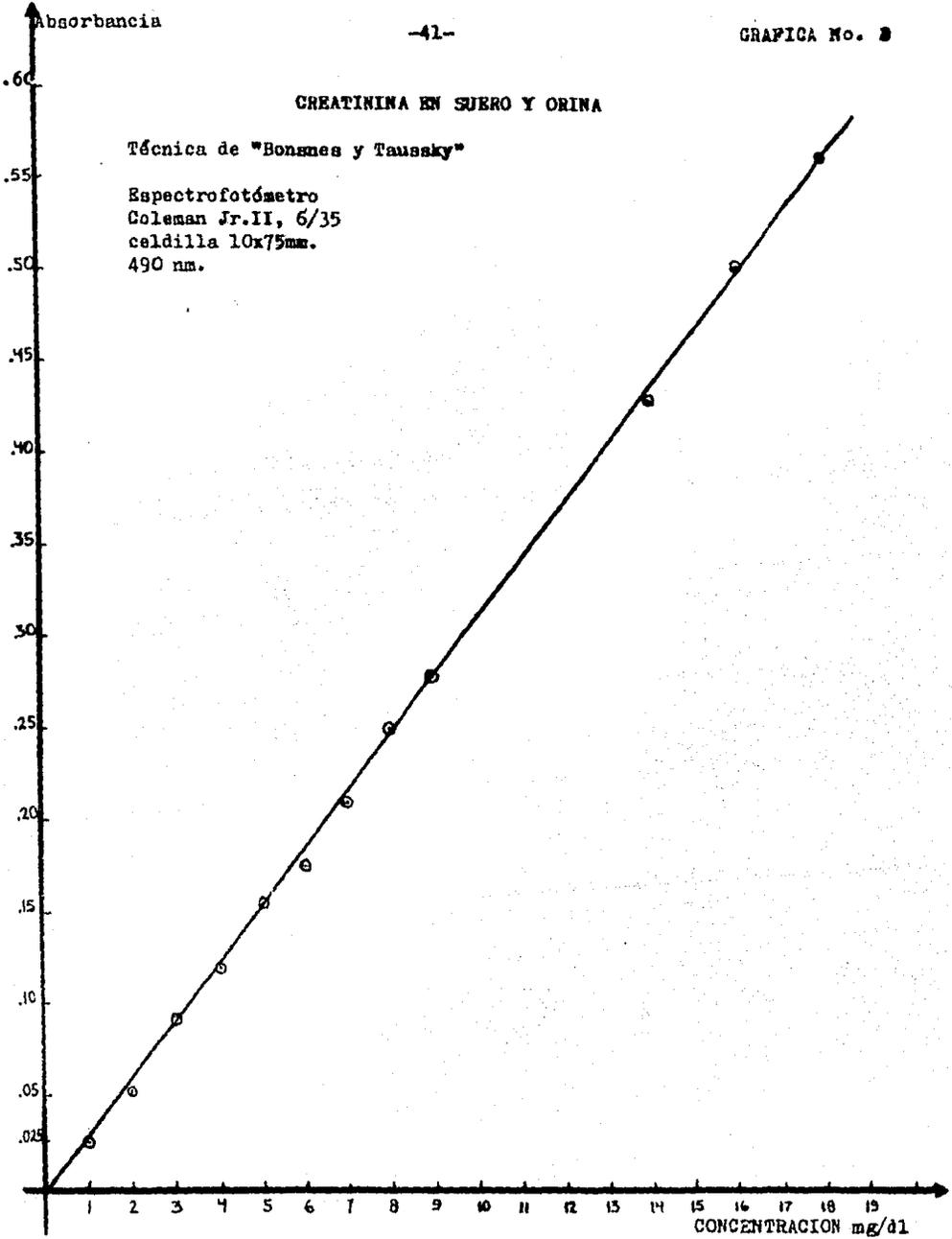
Nota:

El suero control es una mezcla de 20 sueros problema con -
 valores que van de 3 a 5 mg/dl, siendo el promedio 4mg/dl.

CREATININA EN SUERO Y ORINA

Técnica de "Bonsnes y Tausky"

Espectrofotómetro
Coleman Jr. II, 6/35
celdilla 10x75mm.
490 nm.



Ensayo del método de "Bonanes y Tausaky"
para determinación de CREATININA.

Espectrofotómetro

Coleman Jr. 6/35

celdilla 10 x 75 mm.

490 nm.

CALIBRACION:

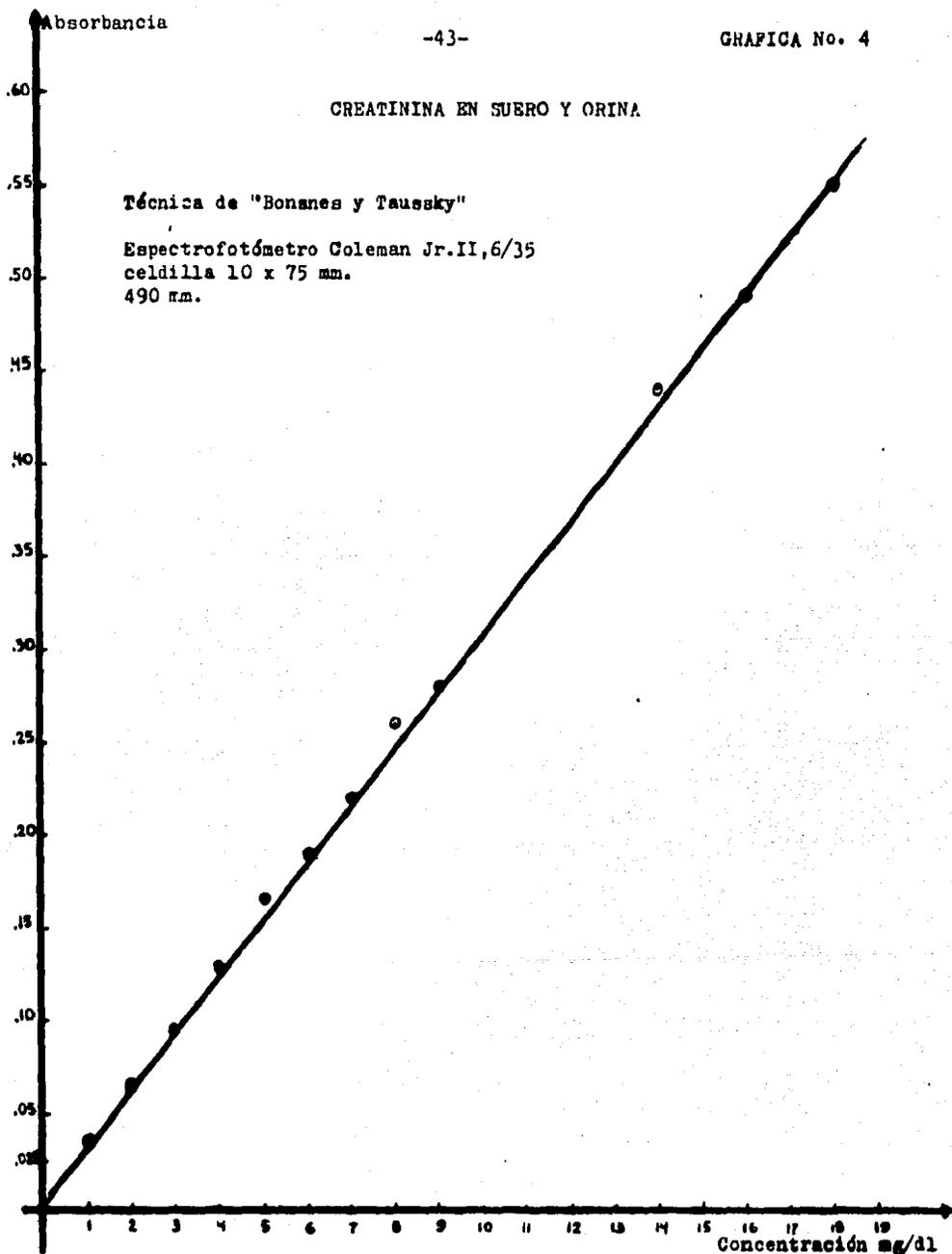
Estándar 1^o Concentración de Creatinina mg/dl	\bar{x} de 3 ensayos D.O.
1	.035
2	.065
3	.096
4	.130
Valores correspondientes a GRÁFICA No. 4	5 .167
	6 .187
	7 .220
	8 .260
	9 .280
	14 .440
	16 .490
	18 .550
Suero control	8 .250

Nota:

El suero control es una mezcla de 20 sueros problema con--
valores que van de 7 a 9 mg/dl, siendo el promedio 8 mg/dl.

CREATININA EN SUERO Y ORINA

Técnica de "Bonanes y Taussky"
Espectrofotómetro Coleman Jr. II, 6/35
celdilla 10 x 75 mm.
490 nm.



2.- ENSAYO DEL METODO DE " OWEN"
 (Adsorción con silicato de aluminio) (21)

FUNDAMENTO:

La creatinina de un filtrado libre de proteínas se -
 transforma en oxalato de creatinina y se adsorbe sobre reactivo
 de "Lloyd" (silicato de aluminio), luego se eluye de éste reac-
 tivo haciéndose reaccionar con una solución alcalina de ácido--
 pícrico y por agitación y centrifugación se forma un color ama-
 rillo-naranja debido probablemente a un tautómero de picrato de
 creatinina que se compara fotometricamente con una solución pa-
 trón de creatinina tratada en la misma forma (21).

MUESTRA: suero ú orina (diluída 1:400)

REACTIVOS:

H₂ SO₄ 2/3 N.
 Tungstato de sodio al..... 10 %
 Sol estandar de creatinina..... 1 mg/ml.
 Sol. saturada de Ac.oxálico..... 10 g/100 ml.
 React. de "Lloyd" (silicato de
 aluminio)..... q.p.

Picrato alcalino:

Sol. saturada de ac. pícrico (1.2g%).. 2.75 ml.
 NaOH 2.5 N..... 5.5 ml.
 Agua destilada c.b.p..... 100 ml.

FILTRADO:

suero	2.0 ml
agua destilada	3.0 ml
Tungstato de sodio al 10 %	1.0 ml
H ₂ SO ₄ 2/3 N	2.0 ml
mezclar, reposar 30 minutos y centrifugar.	

TECNICA: " OWEN"

	P	St	B
Filtrado	5.0 ml	-----	-----
Estandar 1 ^o de creatinina	-----	5.0 ml	-----
Agua destilada	-----	-----	5.0 ml
Sol. saturada de ac. oxálico	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
reactivo de "Lloyd"	100 mg	100 mg	100 mg
Agitar fuertemente c/2' por 10',			
Centrifugar 10' a 200 r.p.m.			
Eliminar sobrenadante. Invertir tubo sobre papel filtro.			
Picrato alcalino	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml
Eluír agitando con varilla de vidrio			
agitar c/2' por 10'			
Centrifugar por 10' a 2000 r.p.m.			
Reposar 10', leer a 490 nm.			

CALCULOS: mg. de Creatinina/dl = $\frac{\text{Absorb. P.}}{\text{Absorb. St.}} \times \text{conc. de St.}$

CALIBRACION:

Estandar de creatinina 1mg/ml.

	<u>mg/100 ml</u>	<u>mcg/ml</u>
Diluir 1:25	16.0	40
1:50	8.0	20
1:100	4.0	10
1:250	1.6	4
1:500	0.8	2
1:1000	0.4	1

DATOS:

Espectrofotómetro Coleman Jr. 6/35, 490 nm.
celdilla 10 x 75 mm.

	<u>Creatinina</u> <u>mg/dl</u>	<u>\bar{x} de 3 valores</u> <u>Absorbancia</u>
	0.4	.028
	0.8	.045
Valores correspondientes	1.6	.100
a GRAFICA No. 5	4.0	.285
	8.0	.50
	16.0	1.15

Estabilidad de la reacción; 20 minutos.

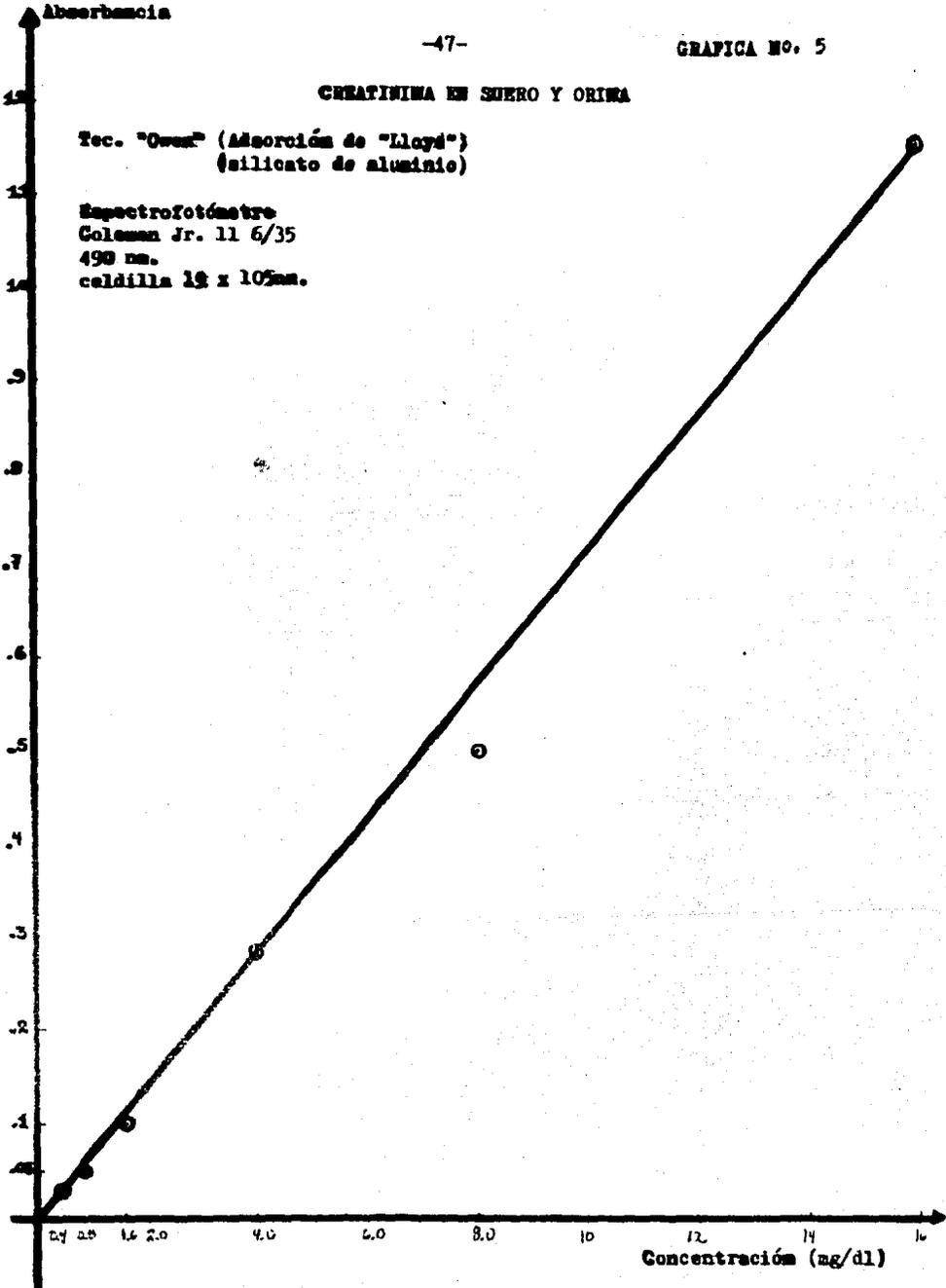
VALORES DE REFERENCIA;

0.68 a 1.06 mg/dl, \bar{x} = 0.87 mg/dl.

CREATININA EN SUERO Y ORINA

Tec. "Owen" (Absorción de "Lloyd")
(silicato de aluminio)

Espectrofotómetro
Coleman Jr. 11 6/35
490 mμ.
caldilla 18 x 105mm.



3.- Método de "Larsen" (modificado)

(Cinética de la reacción)

FUNDAMENTO:

La creatinina presente en suero u orina, forma un compuesto amarillo-naranja con el picrato alcalino. Se mide la cinética-- de la reacción durante el transcurso de la misma en un tiempo-- determinado.

La reacción está protegida de cambios de pH con el uso de - una solución amortiguadora. (25)

MUESTRA:

Suero u orina (diluída 1:100)

REACTIVOS:

Na H CO	0.2 M
Na OH	0.75 N
Ac. pícrico	0.04 M

CALCULOS:

mg/dl de Abs. del P a 6' - D.O del P a 1' x conc. de St.
Creatinina Abs.del St. a 6'-D.O de St. a 1'

TECNICA: (LARSEN)

	P	St	B
Na H CO ₃ 0.2 M Na OH 0.75 N	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
suero u orina (dil. orina 1:100)	0.25 ml	-----	-----
estandar de creatinina(1mg/dl)	-----	0.25ml	-----
agua destilada	-----	-----	0.25 ml
Ac. pícrico 0.04 M	0.5 ml	0.5ml	0.5 ml

Hacer funcionar cronómetro.

Leer absorbancia antes de transcurrido 1 minuto.

Leer absorbancia 5 minutos después de la primera lectura, contra blanco de reactivos.

Espectrofotómetro Coleman Jr II, 6/20 y 6/35, 490 nm.

VALORES DE REFERENCIA: (19)

Suero; Varones de 0.7 a 1.2 mg/dl ó 62 a 106 μ mol/l.

Mujeres de 0.5 a 1.0 mg/dl ó 44 a 88 μ mol/l.

Orina;

Varones de 8.7 a 24.6 mg ó 0.077 a 0.217 mmol/Kg.
de peso corporal en 24 hrs.

Mujeres de 7.3 a 21.4 mg ó 0.065 a 0.189 mmol/kg
de peso corporal en 24 hrs.

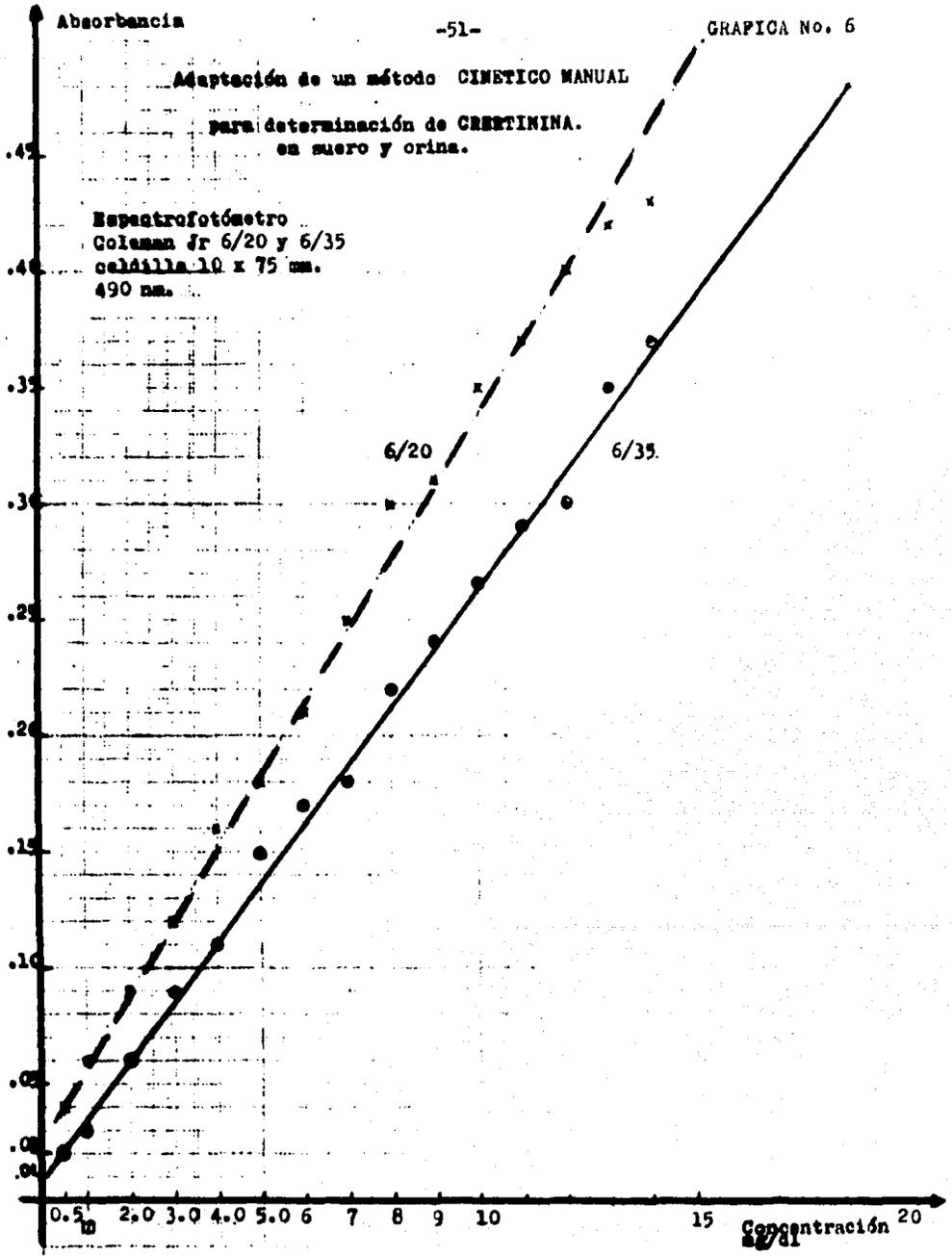
CALIBRACION :

Espectrofotómetro Coleman Jr II, 6/20 y 6/35, 490 nm.

celdilla 10 x 75 mm. Método Cinético.

	Concentración de Creatinina <u>mg/dl</u>	Absorbancia <u>6/35</u>	Absorbancia <u>6/20</u>
	0.5	.02	.04
	1.0	.03	.06
	2.0	.06	.09
	3.0	.09	.12
	4.0	.11	.16
	5.0	.15	.18
Valores	6.0	.17	.21
Correspondientes	7.0	.18	.26
a GRAFICA No.6	8.0	.22	.30
	9.0	.24	.31
	10.0	.265	.35
	11.0	.29	.37
	12.0	.30	.40
	13.0	.34	.42
	14.0	.37	.43
* Sueros	2.0	.06 (2.0)	.09 (2.0)
Control	8.0	.21 (7.8)	.27 (7.9)

* mezcla de sueros problema, cuyo promedio obtenido por determinaciones previas, es de 2.0 y 8.0 mg/dl respectivamente.



PRUEBA DE REPETIBILIDAD: (Tec. " Larsen")

De un " pool " (formado por una mezcla de 40 sueros), se efectuaron 40 determinaciones (5 cada día) - con los siguientes resultados:

" Pool "	Absorbancia <u>6' - 1'</u>	"Pool"	Absorbancia <u>6'-1'</u>
1	.050 = 0.8 mg/dl	21	.049 = 0.7mg/dl
2	.055 0.9	22	.050 0.8
3	.055 0.9	23	.050 0.8
4	.055 0.9	24	.055 0.9
5	.055 0.9	25	.055 0.9
6	.055 0.9	26	.055 0.9
7	.049 0.7	27	.055 0.9
8	.050 0.8	28	.055 0.9
9	.055 0.9	29	.049 0.7
10	.049 0.7	30	.050 0.8
11	.050 0.8	31	.055 0.9
12	.050 0.8	32	.049 0.7
13	.055 0.9	33	.050 0.8
14	.055 0.9	34	.055 0.9
15	.055 0.9	35	.055 0.9
16	.055 0.9	36	.055 0.9
17	.055 0.9	37	.055 0.9
18	.049 0.7	38	.055 0.9
19	.050 0.8	39	.055 0.9
20	.055 0.9	40	.049 0.7

$$\bar{x} = 0.84$$

$$D.S. = 0.07$$

$$C.V. = 8.3 \%$$

PRUEBA DE EXACTITUD, Tec. CINETICA de "Larsen"

Con solución estandar primaria de creatinina a diferentes concentraciones, se efectuaron repetidas determinaciones con los siguientes resultados:

Sol. de Creatinina <u>mg/dl</u>	Resultados (mg/dl)		
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
0.5	0.4	0.5	0.5
1.0	1.0	1.1	1.1
2.0	2.1	2.0	2.0
3.0	3.1	3.0	3.1
4.0	4.0	4.1	4.0
5.0	5.0	5.1	5.2
6.0	6.0	6.2	6.0
7.0	7.1	7.0	7.0

Espectrofotómetro

Coleman Jr. 11 6/20 y 6/35

490 nm. celdilla 10 x 75 mm.

b).- EVALUACION DE METODOS CINETICOS:

El primer ensayo se fundamentó con estudios hechos por A.M. Gachon, B. Dastugue en la " Adaptación en micrométodo de -- una técnica cinética manual para la determinación de Creatinina" (comercializada por laboratorios Boehringer) (1)

REACTIVOS:

- 1.- NaOH 0.32 N (12.8 g/l)
- 2.- Ac. pícrico 35.01 mmol/l (8.04 g/l)
- 3.- Sol. de creatinina 1mg/ml (dls. de la 7mg/dl)

TECNICA:

(ensayo No. 1)

	P	St	B
1.- Mezclar reactivos 1 y 2 30' antes de la reacción (mantener \pm a 25 °c) y medir.	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
2.- Suero	0.25 ml	-----	-----
3.- Estandar (1 mg/dl)	-----	0.25ml	-----
4.- Agua destilada	-----	-----	0.25ml
5.- Cronometrar			
6.- Leer absorción a 490 nm. a los primeros 30" de la reacción.			
7.- Leer la absorción a los 2'30".			

CALIBRACION (de ensayo No. 1)
mg/dl de

\bar{x} de 3 ensayos

Creatinina

2a.-1a. lect. (absorbancia)

	0.5	0.04
	1.0	0.06
	2.0	0.07
Valores	3.0	0.085
Correspondientes		
a gráfica	4.0	0.11
No. 7	5.0	0.12
	6.0	0.14
	7.0	0.16
Sueros	2.0	0.065(1.8mg/dl)
control	3.2	0.085(3.0mg/dl)

Suero control: valores obtenidos de un " pool" (mezcla de sueros problema con valores predeterminados), siendo el promedio de un lote 2.0 mg/dl y otro de 3.2 mg/dl)

CALCULOS:

$$\text{mg/dl de Creatinina} = \frac{\text{Absorb. del P. (2a.-1a.lect)}}{\text{" st. " " "}} \times \text{Conc. de St.}$$

RESULTADOS:

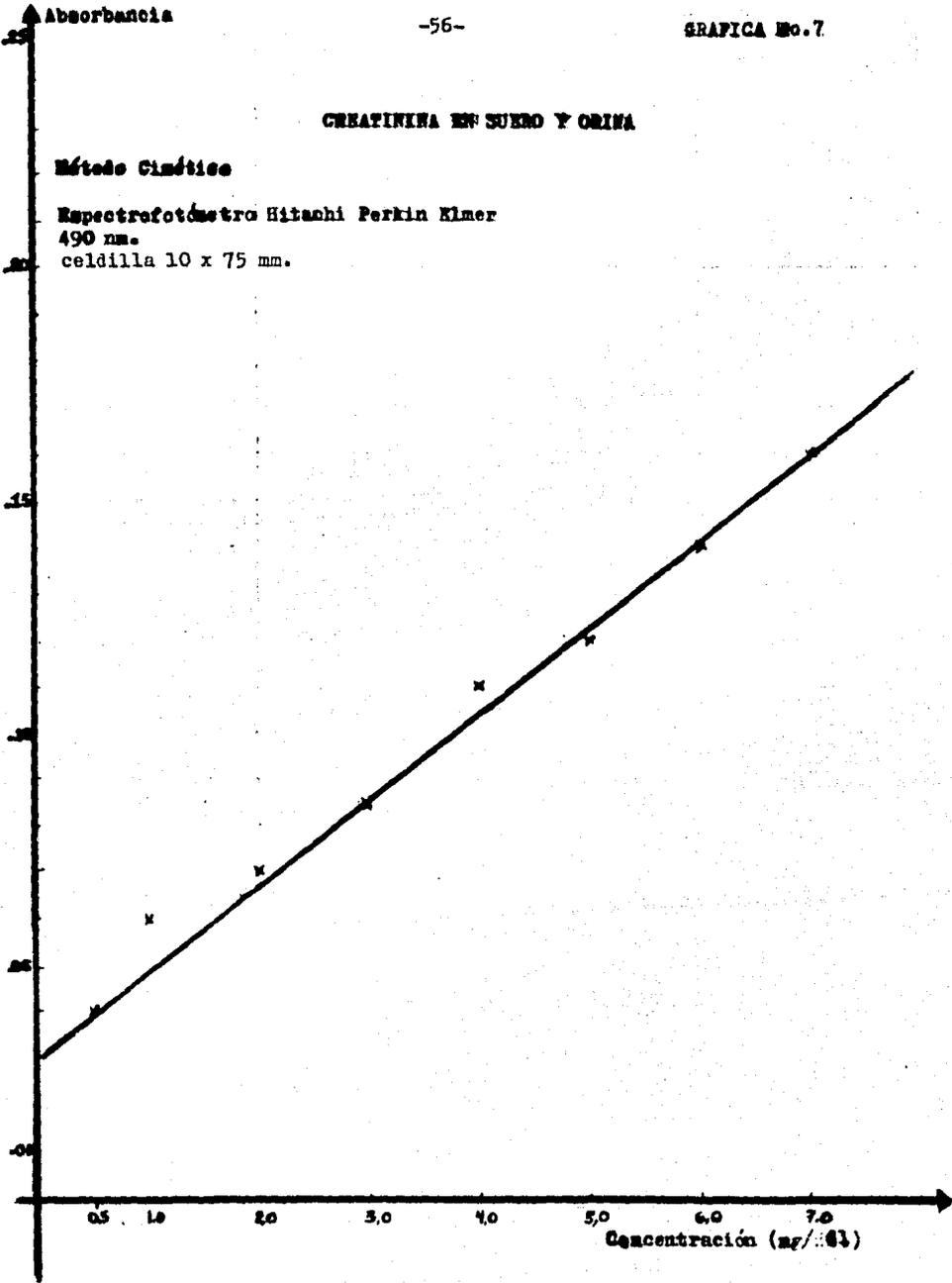
pH de la mezcla de NaOH/ac. pícrico.....12

+ suero.....11.9

CREATININA EN SUELO Y ORINA

Método Cinético

**Espectrofotómetro Hitachi Perkin Elmer
490 nm.
celdilla 10 x 75 mm.**



De acuerdo a los resultados obtenidos y a la bibliografía consultada, se efectuaron las siguientes modificaciones:

- 1.- Se introduce una sol. de pH alcalino (9)
- 2.- Se cambió el orden de reactivos. (16)
- 3.- Se modifica el volumen de reactivos. (1)
- 4.- Se considera la cinética de reacción a los 5'.

TECNICA:

	P	ST	B
Na H CO ₃ 50 mM/l (4.2g/l) ---			
Na OH 0.32 N (12.8g/l) -----	2.0ml	2.0ml	2.0ml
Suero (u'orina dil. 1:100)	0.3ml	-----	-----
Estandar (1mg/dl)	-----	0.3ml	-----
Agua destilada	-----	-----	0.3ml
Ac. pícrico 35.01mM/l (8.02g/l)	1.0ml	1.0ml	1.0ml
Mezclar, cronometrar a los 30", 2' 30" y 5'.			
490 nm.			

CALIBRACION:

	Concentración Creatinina <u>mg/dl</u>	Absorbancia <u>2'30"</u>	Absorbancia <u>5'</u>
	0.5	.026	.044
	1.0	.030	.055
	2.0	.044	.088
Valores corresp. a GRAFICA No.8	3.0	.058	.101
	4.0	.077	.137
	5.0	.090	.153
	6.0	.101	.180
	7.0	.109	.201

Suero control (valor teórico)	1.9	.138 (1.6)	.075(1.8)
----------------------------------	-----	------------	-----------

	Na H CO ₃ 50 mM/l	<u>pH</u> 9.0
+	Na OH 0.32 N	11.5
+	suero	11.5
+	ácido pícrico	11.4

Absorbancia

-59-

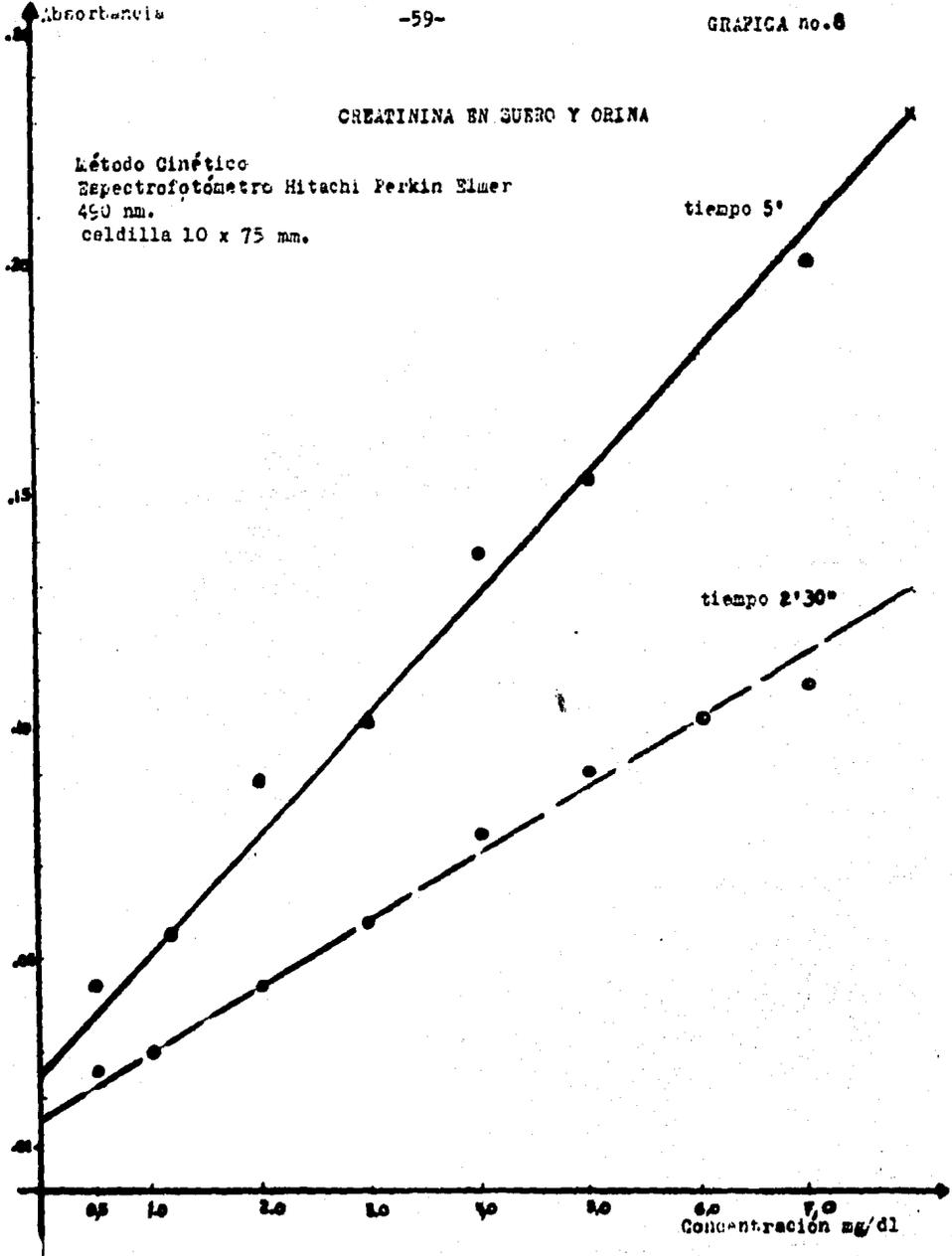
GRÁFICA no. 8

CREATININA EN SUERO Y ORINA

Método Cinético
Espectrofotómetro Hitachi Perkin Elmer
450 nm.
celdilla 10 x 75 mm.

tiempo 5'

tiempo 2'30"



Se efectuará otro ensayo según estudios de H. Bartels y M. Bohmer (19) (comercializado por laboratorios Merck), con -- las siguientes variantes:

- 1.- Se utilizará menor cantidad de muestra.
- 2.- La solución reguladora de pH de bicarbonato se cambiará por fosfatos.
- 3.- Se cambiará el orden de reactivos, ya que según estudios realizados por G. Vanzetti (16) no es conveniente iniciar la reacción con la adición de una solución de pícrato alcalino, ya que es poco estable pudiendo hacer el blanco termostático formándose un color amarillento, es preferible diluir primero el suero con solución reguladora de pH alcalina e iniciar la reacción con solución acuosa de -- ac, pícrico.

REACTIVOS:

- 1.- Solución amortiguadora alcalina.
(NaOH 313 mM/l) (12.5 g/l)
(Fosfato 12.5 mM/l) (3.25 g/l)
- 2.- Ac. pícrico, 8.73mM/l (1.99 g/l)
- 3.- Sol. estandar de Creatinina (1 mg/dl)

Conservar reactivos a temperatura ambiente (15-25°C).

TECNICA:

	P	ST	B
Suero (ú orina dil. 1:100)	0.5 ml	-----	-----
Estandar de creatinina(1mg/dl)	-----	0.5 ml	-----
Agua destilada	-----	-----	0.5ml
Mezclar, ajustar a temperatura de reacción deseada			
Sol. amortiguadora alcalina	1.0ml	1.0ml	1.0ml
Mezclar y leer antes de transcurrido 1'			
Leer a los 5' después de la primer lectura.			

Se sustituye la sol. amortiguadora de fosfatos

($\text{NaOH}/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) con pH 12.1 por una de carbonato ácido ($\text{NaOH}/\text{NaHCO}_3$ 50 mM) de pH 11.9 (4.2 g/l).

TECNICA:

	P	ST	B
Sol. amortiguadora alcalina; (1:1) NaOH 0.32N/ NaHCO_3 50mM.	1.0ml	1.0ml	1.0ml
Suero	0.5ml	-----	-----
Estandar (1 mg/dl)	-----	0.5ml	-----
Agua destilada	-----	-----	0.5ml
Cronometrar y leer antes de 1' y 5' después a 490 nm.			

CALIBRACION:

	<u>Cratinina</u> <u>mg/dl</u>	<u>Absorbancia</u> <u>5' - 1'</u>
Valores corresp. a	1.0	.048
	2.0	.098
GRAFICA No.9	3.0	.137
suero control	1.0	.058 (1.2mg/dl)
(valor teórico)	1.7	.068 (1.6 mg/dl)

RESULTADOS:

NaHCO_3 (9.1) + NaOH	pH=	11.95
suero	"	11.9
ac. pícrico	"	11.85

Absorbancia

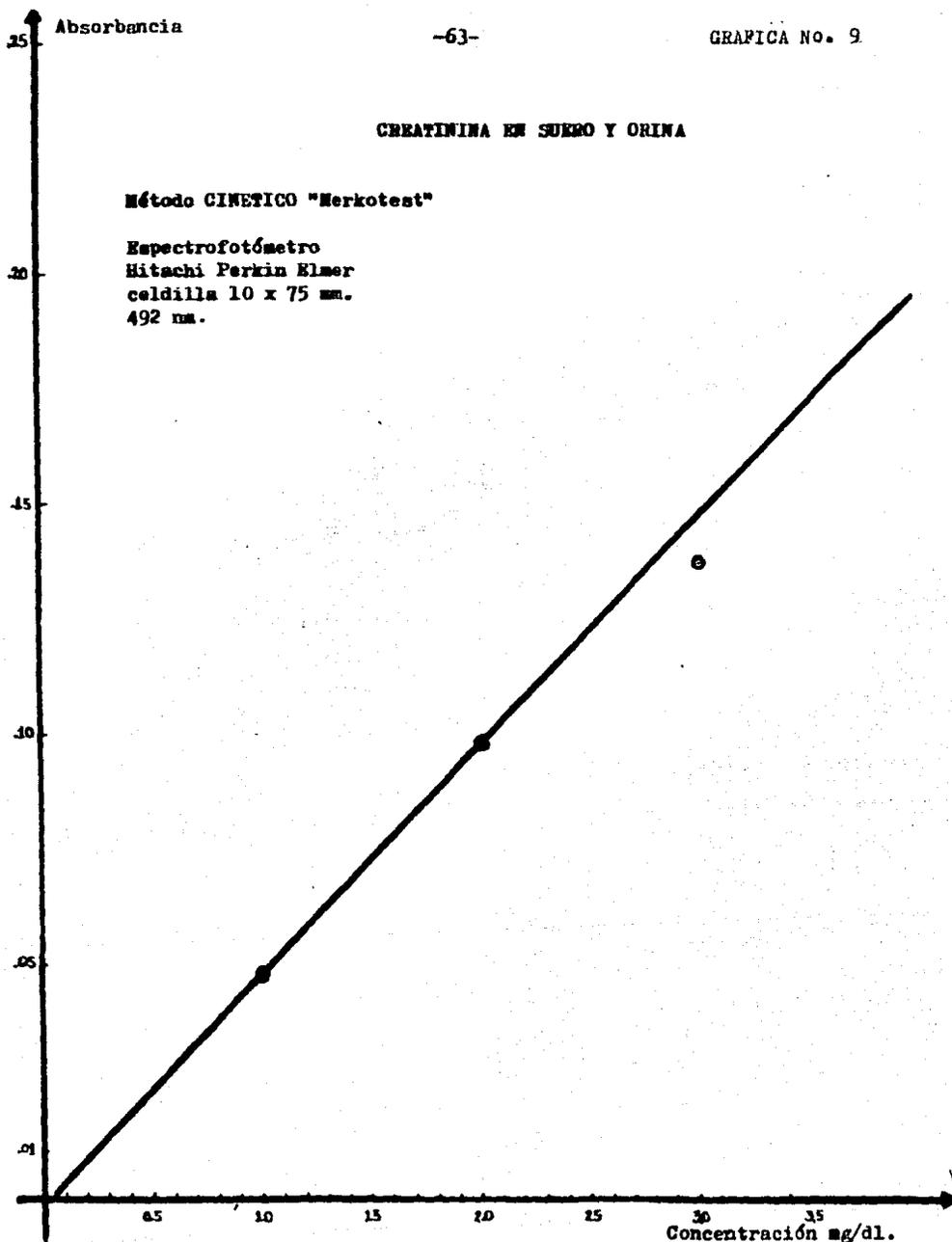
-63-

GRAFICA No. 9

CREATININA EN SUECO Y ORINA

Método CINÉTICO "Merkotest"

Espectrofotómetro
Hitachi Perkin Elmer
celdilla 10 x 75 mm.
492 mμ.



Según estudios de "Knud Larsen" (25) en su "Ensayo de - creatinina por un principio de reacción cinética", presenta -- las siguientes variantes:

- El ácido pícrico es ligeramente menos concentrado
- El volumen tanto de muestra como de reactivos es mucho menor, pues se trata de un micrométodo.
- El tiempo de reacción es menor.

TECNICA:

	P	ST	B
NaOH 1M/NaHCO ₃ 0.2M (1:1)	200µl	200µl	200µl
Suero	200µl	-----	-----
Estandar (1mg/dl)	-----	200µl	-----
Agua destilada	-----	-----	200µl
Ac. pícrico	700µl	700µl	700µl
Leer absorbancia a los 60 y 120"			
Espectrofotometro semiautomático Beckman mod. 42			

CALIBRACION:

	<u>Creatinina</u> <u>mg/dl</u>	<u>Absorbancia</u> <u>490 nm</u>
	1	0.37
	2	0.62
Valores	4	.132
corresp. a	6	.195
GRAFICA	8	.254
No. 10	10	.337
	12	.373
	14	.488

Cambiando el orden de reactivos se observa una ligera-modificación. (1)

TECNICA:

	P	ST	B
Suero	200ul	-----	-----
Estandar (1mg/dl)	-----	200ul	-----
Agua destilada	-----	-----	200ul
NaOH 1M/NaHCO ₃ 0.2M (1+1)	200ul	200ul	200ul
Ac. pícrico	700ul	700ul	700ul

CALIBRACION:

	<u>Cratinina</u> <u>mg/dl</u>	<u>Absorbancia</u> <u>490 nm.</u>
	1	.045
	2	.066
	4	.19
Valores correspondientes a GRAFICA No. 10	6	.25
	8	.32
	10	.37
	12	.48
	14	.45

Absorbancia

-66-

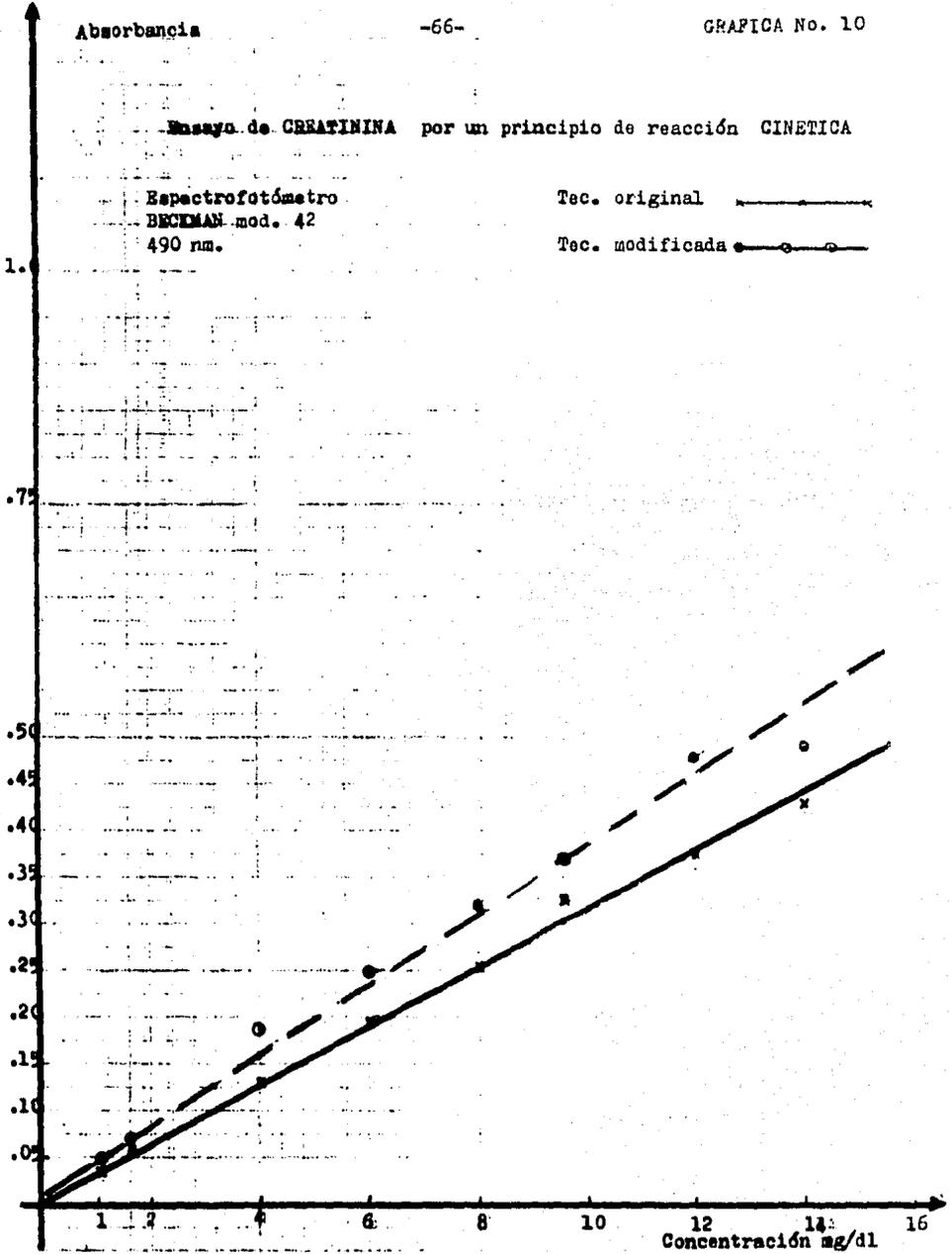
GRAFICA No. 10

Ensayo de CREATININA por un principio de reacción CINÉTICA

Espectrofotómetro
BECKMAN mod. 42
490 nm.

Tec. original

Tec. modificada



La siguiente modificación se hace según G. Vanzetti Primatio (16) en su estudio sobre un "Método directo cinético para la determinación de creatinina en líquidos biológicos".

REACTIVOS:

- | | |
|--|----------------------|
| 1.- NaHCO_3 50mM (4.2g/l).....50 ml | } mezcla
alcalina |
| 2.- NaOH 0.6N (24.0g/l).....22.7ml | |
| 3.- Sol. saturada de ac. pícrico (1.2%) | |
| 4.- Estandar de creatinina (1mg/dl) | |

Este método se trabaja con las siguientes variantes:

- Se aumenta el volumen de reacción 2.5 veces más, para alcanzar a leer en las celdas comunes.
- Se aumenta el tiempo de reacción (ya que los autores trabajan con autoanalizador automático de control de temperatura constante).

TECNICA:

	P	ST	B
Mezcla diluyente alcalina	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Suero (0.1 ml)	0.25ml	-----	-----
Estandar (1mg/dl)	-----	0.25ml	-----
Agua destilada	-----	-----	0.25
Ac. pícrico 1.2 % (0.1ml)	0.25ml	0.25	0.25
Cronometrar y leer absorbancia (490nm) a 5 y 10"			

CALIBRACION:

	Concentración de Creatinina <u>mg /dl</u>	Absorbancia <u>5' - 1'</u>	Absorbancia <u>10' - 1'</u>
	0.5	.028	.042
	1.0	.033	.050
	2.0	.054	.078
Valores correspondientes a GRAFICA No. 11	3.0	.07	.108
	4.0	.095	.135
	5.0	.116	.165
	6.0	.134	.185
	7.0	.137	.205
Sueros	2.0	.055	
control	8.0	.154	

Mezcla de sueros problema cuyas determinaciones previas dieron un promedio de 2.0 y 8.0 mg/dl.

RESULTADOS:

	<u>pH</u>
NaHCO ₃ 50 mM	9.0
+ Na OH 0.6N	11.9
+ suero.....	11.8
+ ac. pícrico.....	11.75

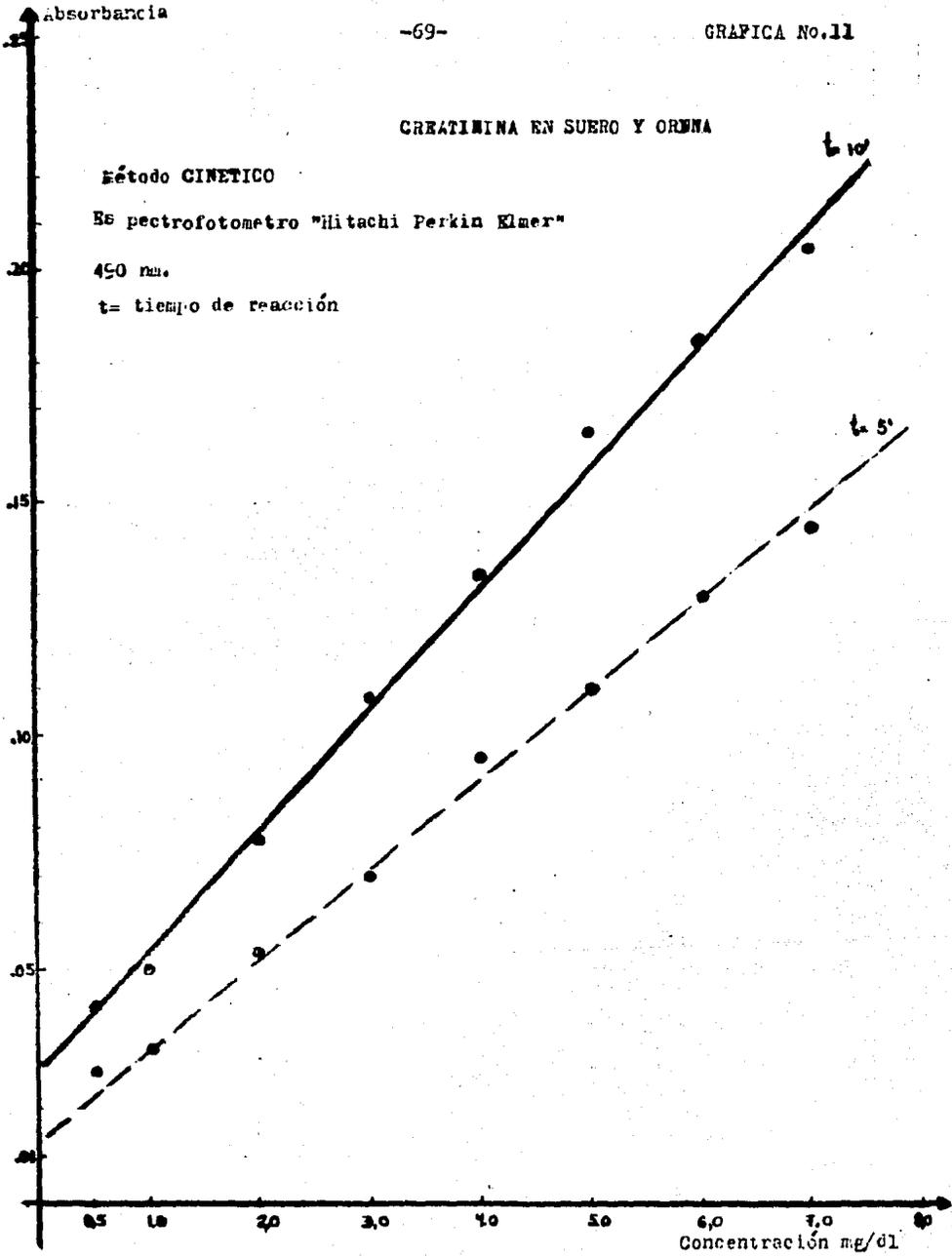
CREATININA EN SUERO Y ORINA

Método CINÉTICO

Espectrofotómetro "Hitachi Perkin Elmer"

450 mμ.

t = tiempo de reacción



Según el método original de G. Vanzetti Primatio (16)- se efectuarán las siguientes modificaciones:

- Se aumentará la concentración de ácido pícrico.
- Las cantidades de la mezcla alcalina se llevarán a números completos para simplificar el método.

TECNICA:

	P	ST	B
Na HCO ₃ 50 mM (50ml) 2:1 (1ml)			
Na OH 0.6N (22.7 ml)	2.5 ml	2.5ml	2.5 ml
Suero (0.1ml)	0.25ml	-----	-----
Estandar (1 mg/dl) (0.1ml)	-----	0.25ml	-----
Agua destilada (0.1ml)	-----	-----	0.25ml
Ac. pícrico (de 1.2% ; 0.1ml a 1.2g/l)	0.25ml	0.25ml	0.25ml
Cronometrar y leer extinción a 1' y 5' en 508 nm.			
Na H CO ₃ 50mM 2:1		<u>pH</u>	
Na OH 0.6 N	2.5 ml.....	11.95	
+ suero		11.8	
+ ac. pícrico		11.85	

CALIBRACION:

	Concentración de Creatinina <u>mg/dl</u>	Absorbancia <u>5'-1'</u>	Absorbancia <u>10'-1'</u>
	0.5	.01	.028
	1.0	.023	.040
	2.0	.025	.052
	3.0	.035	.070
Valores corresp. a GRAFICA	4.0	.045	.085
	5.0	.055	.105
No.12	6.0	.066	.117
	7.0	.075	.139
Sueros	0.9	.014 (0.8 mg/dl)	
control	2.0	.028 (2.2 ")	
(t+)	8.0	.055 (8.2)	

t+ = valor teórico.

Absorbancia

-72-

GRÁFICA No.12

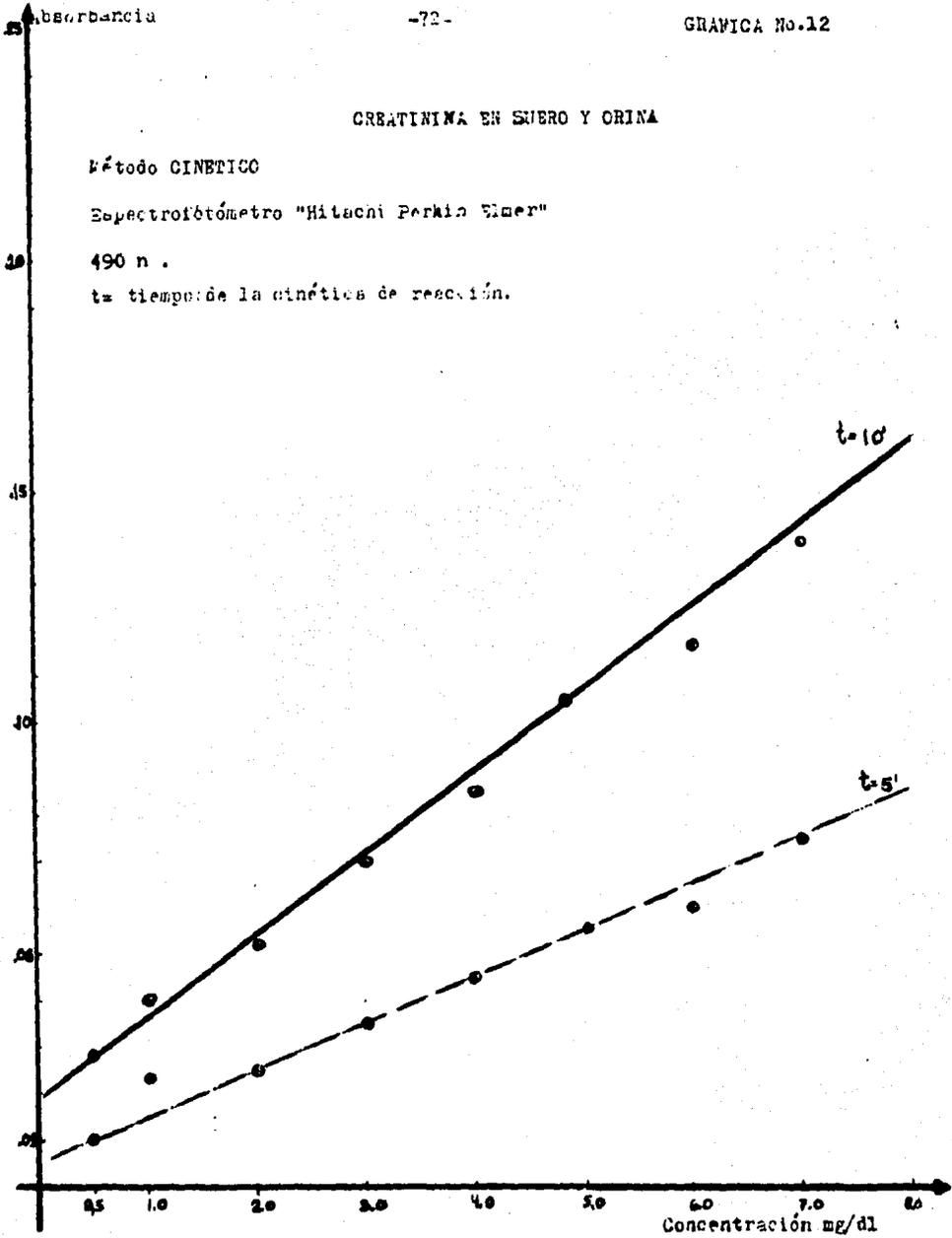
CREATININA EN SUERO Y ORINA

Método CINÉTICO

Espectrofotómetro "Hitachi Perkin Elmer"

490 m.

t = tiempo de la cinética de reacción.



Del método anterior se modifica solamente la longitud de onda, en vez de 508, como indica el método original (16), se lee a 490nm que resultó ser la máxima absorción según estudio efectuado al inicio de éste trabajo.

CALIBRACION:

	<u>Concentración Creatinina mg/dl</u>	<u>Absorbancia 5'-1'</u>
	0.5	.027
	1.0	.039
	2.0	.055
GRAFICA	3.0	.073
No.13	4.0	.092
	5.0	.107
	6.0	.120
	7.0	.135
Sueros control	1.9 (dã 1.7mg/dl)	
t +	2.0 (1.8 ")	
	8.0 (7.2 ")	

t + ; valor teórico

.25

Absorbancia

-74-

GRAFICA No. 13

Método directo CINETICO para determinación
de CREATININA en suero y orina.

Espectrofotómetro
Hitachi Perkin Elmer
490 nm.

.20

.15

.10

.05

.01

0.5

1

2

3

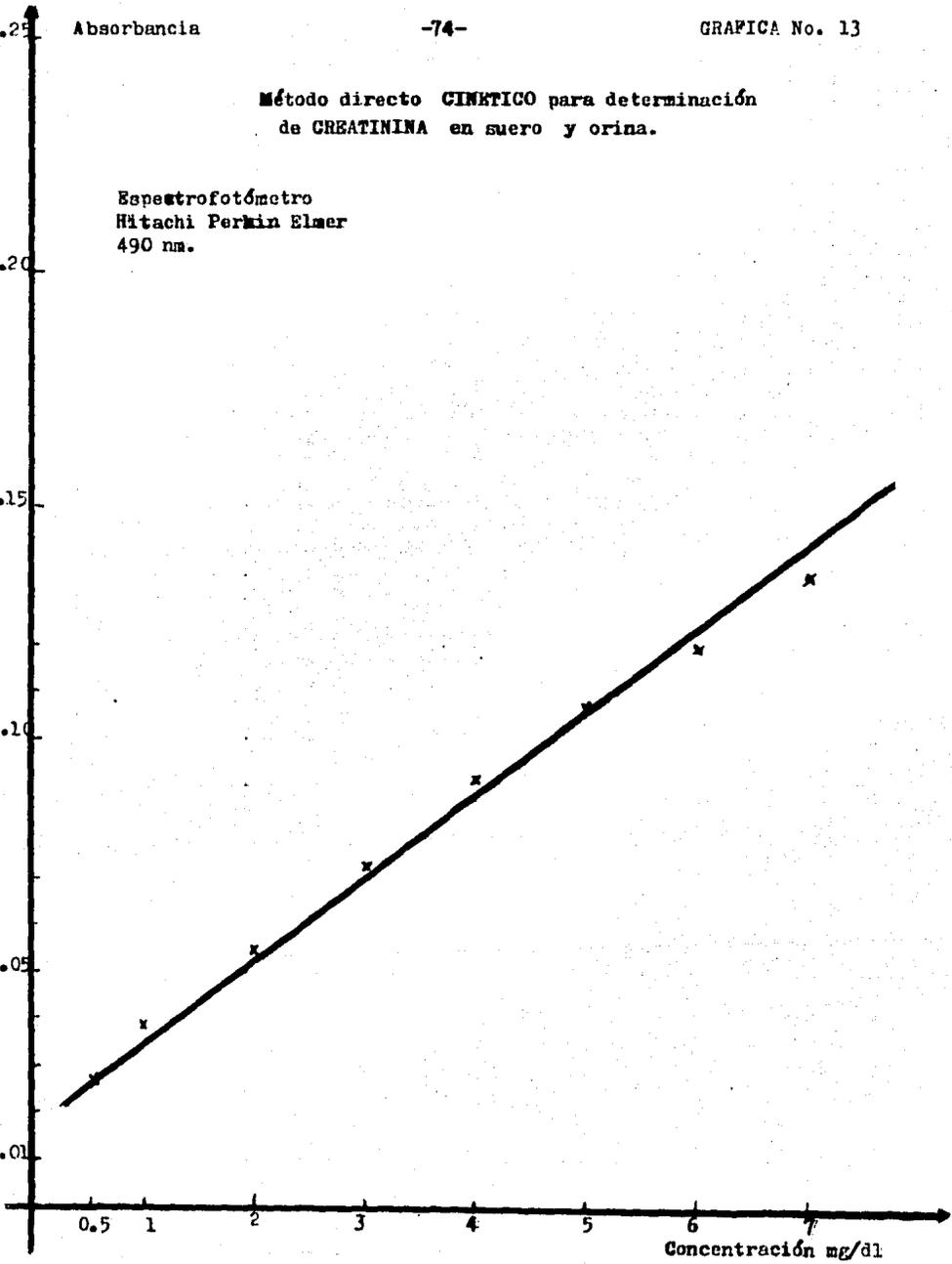
4

5

6

7

Concentración mg/dl



Se desea aumentar la absorción inicial (ya que es muy baja):

-Aumentando la concentración de NaHCO_3 de 50 mM a 0.2 M.

-Disminuyendo el volumen de mezcla de solución reguladora alcalina.

-Aumentando el volumen de suero y ác. pícrico.

-Ac. pícrico cambia de 1.2 g/l a 1.2 g %.

TECNICA:

		P	ST	B
PH	Na H CO 0.2 m - 2 ml			
11.9	na OH 0.6N 1 ml	1.5ml	1.5ml	1.5ml
11.88	Suero	0.5ml	-----	-----
11.85	Ac. pícrico 1.2 g%	0.5ml	0.5ml	0.5ml
Leer absorbancia al primer minuto y 5' después. 490nm, y 508 nm.				

CALIBRACION:

	<u>Concentración</u> mg/dl	<u>Absorbancia</u> 508nm	<u>Absorbancia</u> 490nm
	0.5	.035	.055
	1.0	.06	.078
	2.0	.075	.128
Valores	3.0	.088	.180
corresp.	4.0	.108	.228
a Graf.# 14	5.0	.122	.260
	6.0	.135	.320
	7.0	.153	.338

Absorbancia

-75-

Gráfico No. 14

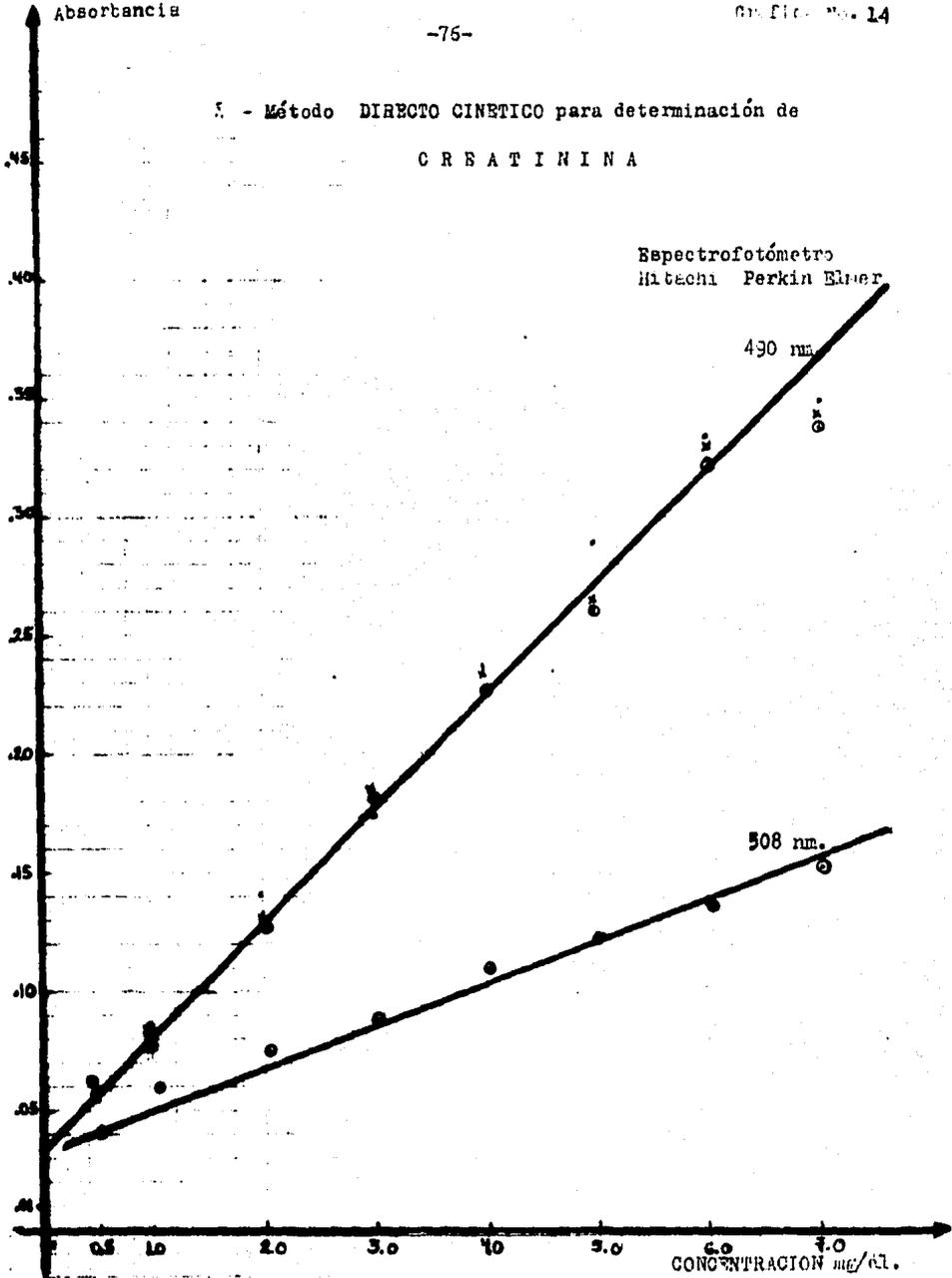
Método DIRECTO CINÉTICO para determinación de
CREATININA

Espectrofotómetro
Hitachi Perkin Elmer

490 nm.

508 nm.

CONCENTRACION mg/él.



Otra modificación al método para simplificar el mismo, es poner a partes iguales las soluciones que forman la mezcla--alcalina reguladora de pH.

-Se efectúan lectura en espectrofotómetro automático -- Beckman mod. 42 y Coleman Jr 11 6/20 y 6/35.

-Debido a que los reactivos son muy semejantes a los -- utilizados en la institución donde se realizó éste tra bajo (I.M.S.S., Clínicas 24 y 18) se ensayará una modificación con dichos reactivos.

TECNICA:

		pH
Na H CO ₃ 0.2M	-----	9.4
Na OH 0.6 N	1:1 1.5 ml	11.9
Suero	0.5 ml	11.85
Ac. pícrico 1.2 %	0.5 ml	11.8
(Dilución 1:10) Vol. total	2.5 ml	
1ª lect. a los 60", 2a. lect. a los 5' después.		
Temp. 25 °C	Espectrofotómetro	
490 nm.	Beckman mod. 42	

REACTIVOS I.M.S.S. :

Na OH 0.75 N

Ac. pícrico 0.04 M (apro. 1.0 %)

CALIBRACION

Espectrofotometro
Beckman mod. 42

<u>Creatinina</u> <u>mg/dl</u>	<u>Absorbancia</u> <u>5'-1'</u>
2.0	0.235
4.0	0.432
6.0	0.672
8.0	0.880
10.0	-----

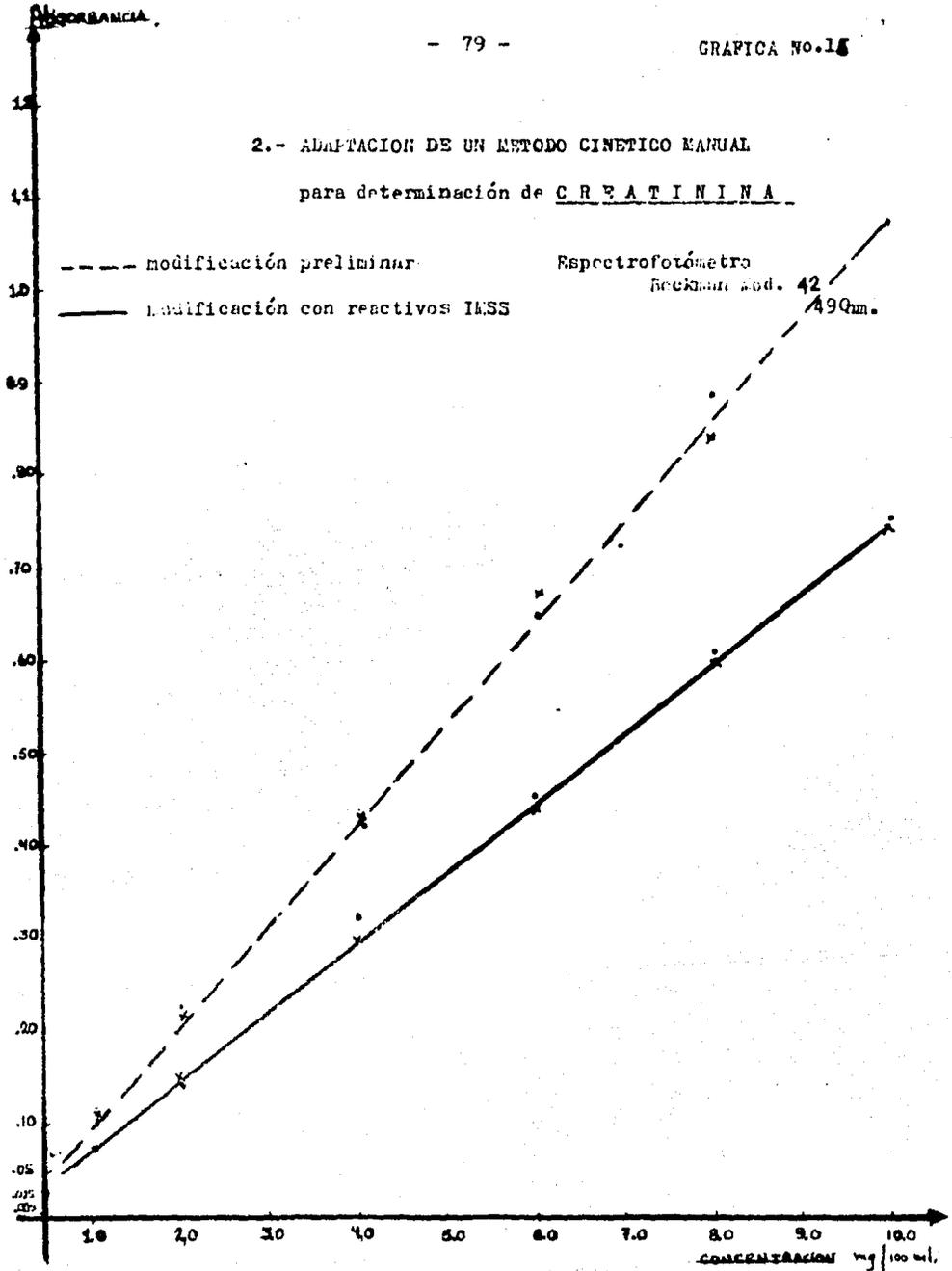
CALIBRACION (reactivos IMSS)

Valores
correspondiente
a GRAFICA No.15

<u>Creatinina</u> <u>mg/dl</u>	<u>Absorbancia</u> <u>5'-1'</u>
1.0	0.109
2.0	0.168
4.0	0.348
6.0	0.460
8.0	0.596
10.0	0.786

2.- ADAPTACION DE UN METODO CINETICO MANUAL

para determinación de C R E A T I N I N A



Se aumenta la sensibilidad del método con la siguiente modificación:

TECNICA:		
Na HCO ₃ 0.2M	} partes iguales.....	1.5 ml
NaOH 0.75 N		
Suero		0.25 ml
Ac. pícrico 0.04 M.....		0.5 ml
(dil; 1:9)	Vol. total.....	2.25 ml
<p>la lectura antes de 1'</p> <p>2a. " a los 5' después de la 1^a lectura.</p> <p>Temperatura 25°C ..</p>		

CALIBRACION:

Espectrofotómetro
Beckman mod. 42
Long. onda 490 nm.

Concentración <u>mg/dl</u>	Absorbancia <u>5' - 1'</u>
1.0	.037
2.0	.062
4.0	.132
6.0	.195
8.0	.254
10.0	.337
12.0	.373
14.0	.428

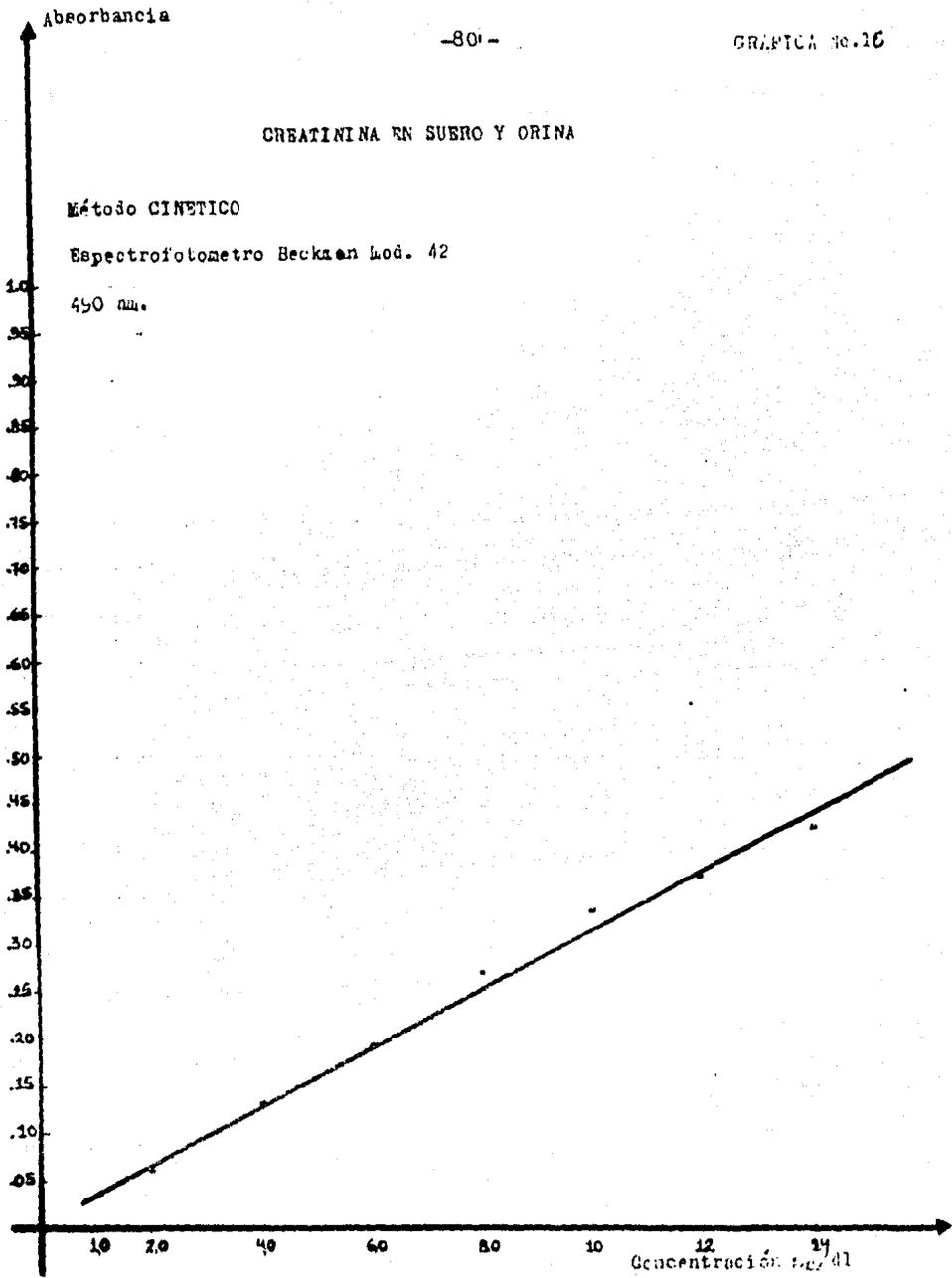
Valores
correspondientes
a GRAFICA No. 16

CREATININA EN SUELO Y ORINA

Método CINETICO

Espectrofotometro Beckman Mod. 42

450 nm.



Debido a que el espectrofotómetro Beckmen mod. 42. no es común en el laboratorio clínico de rutina pues en general no se cuenta con aparatos automatizados, además de que el objetivo de éste trabajo es adaptar una técnica manual simplificada que no requiera de aparatos sofisticados, se adapta el método a un espectrofotómetro de uso común como es el Coleman Jr. 11 6/20 y 6/35.

La gráfica # 6 se presenta al principio de éste capítulo como la " Adaptación a una técnica cinética manual para determinación de creatinina en suero y orina " según el método original de " Larsen " , y fué con la que se practicaron las muestras problema y compararon con los otros dos métodos ya establecidos por " Bonsnes y Taussky" y Owen".

CAPITULO V

R E S U L T A D O S .

E V A L U A C I O N .

E S T A D I S T I C A .

Se analizaron 50 muestras de suero en pacientes sin alteración renal, 50 muestras de sueros de pacientes con alteración renal y 50 muestras de orina de pacientes de ambos tipos.

Los sueros fueron obtenidos estando los pacientes en ayunas y las muestras de orina del volumen recolectado durante 24 horas.

Se trabajó con suero y plasma (ya que en los glóbulos rojos interfieren cromógenos presentes en cantidades considerables) (33)

Todas las muestras fueron sometidas al mismo tratamiento con la metodología que a continuación se indica.

Así mismo las determinaciones de las muestras problema como de las curvas de calibración, fueron hechas por triplicado y los resultados que se presentan son el promedio.

Resultados obtenidos en la determinación de creatinina en suero de pacientes sin alteración renal que acuden a consulta externa en la Unidad de Medicina Familiar No. 18 del I.M.S.S.

La lectura de los problemas se realizó en espectrofotómetro Coleman Jr. 6/35 y 6/20 a una longitud de onda de 490 nm.

No.	Tec. de Bonsnes y <u>Tausky</u>	Tec. Cinética <u>"Larsen"</u>	Tec de Adsorción <u>"Owen"</u>
1	0.8 mg/dl	0.5 mg/dl	0.4 mg/dl
2	1.15 "	0.93	0.9
3	0.8	0.7	0.6
4	0.7	0.7	0.6
5	1.0	0.82	0.8
6	1.3	1.4	1.0
7	0.86	0.8	0.75
8	0.8	0.62	0.5
9	0.9	1.22	0.8
10	1.39	1.22	1.0
11	0.8	0.6	0.5
12	0.9	0.8	0.8
13	0.84	0.8	0.5
14	0.8	0.65	0.5
15	1.2	1.0	0.8
16	0.9	0.8	0.7

No.de muestra	Tec. de Bonsnes y <u>Tausky</u>	Tec. Cinética <u>"Larsen"</u>	Tec de Adsorción <u>"Owen"</u>
17	0.94 mg/dl	0.82mg/dl	0.7 mg/dl
18	1.9	1.84	1.78
19	0.82	0.8	0.7
20	0.7	0.6	0.5
21	1.1	1.0	0.8
22	2.12	2.0	1.82
23	2.1	2.0	1.8
24	1.2	1.1	1.0
25	0.9	0.7	0.5
26	1.6	1.4	1.3
27	1.1	0.9	0.8
28	0.9	0.8	0.5
29	1.8	1.6	1.5
30	1.25	1.1	1.0
31	1.1	0.95	0.8
32	1.7	1.5	1.3
33	2.2	2.1	2.0
34	0.9	0.8	0.8
35	1.8	2.1	1.8
36	1.1	0.9	1.1
37	0.6	0.6	0.5

No. de muestra	Tec. Bonsnes y Taussky	Tec. Cinética	(Tec. de adsorción;Owen)
38	0.5 mg/dl	0.5mg/dl	0.42 mg/dl
39	0.7	0.6	0.5
40	1.0	0.9	0.8
41	1.7	1.5	1.3
42	1.0	0.8	0.7
43	0.9	0.8	0.5
44	1.0	0.9	0.8
45	1.0	0.8	0.9
46	1.1	0.9	0.6
47	1.3	1.1	1.0
48	1.4	1.2	1.0
49	1.3	1.0	0.9
50	1.5	1.3	1.1

Evaluación estadística de los resultados obtenidos en la determinación de creatinina, en suero de pacientes sin alteración renal. (Considerando valores de 0.5 a 1.5 mg/dl). Las medidas estadísticas que se tomaron fueron ; media (\bar{x}), desviación estandar (D.S.) y coeficiente de variación (C.V).

$$\bar{x} = \frac{n_1 + n_2 + \dots + n_n}{n}$$

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

$$C.V. = \frac{D.S.}{\bar{x}} \times 100$$

Tec. (punto final)	Tec. Cinética	Tec. Adsorción
" <u>Bonnes y Tausky</u> "	" <u>Larsen</u> "	" <u>Owen</u> "
$\bar{x} = 0.98$	0.89	0.82
D.S = 0.22	0.25	0.26
C.V. = 22.9 %	28.1 %	32.4 %

Resultados obtenidos en la determinación de creatinina en suero de pacientes con alteración renal que se encuentran -- hospitalizados y acuden a consulta externa en el Hospital General de Zona No. 24 del I.M.S.S.

La lectura de los problemas se realizó en espectrofotómetro Coleman Jr. 6/35 y 6/20 a una longitud de onda de 490 nm.

No. de muestra	Tec. de <u>"Bonnes y Tausky"</u>	Tec. Cinética <u>"Larsen"</u>	Tec. Adsorción <u>"Owen"</u>
1	15.0 mg/dl	12.0 mg/dl	10.5 mg/dl
2	11.0	11.3	9.0
3	5.8	5.5	5.0
4	26.0	21.0	20.5
5	25.2	22.0	21.0
6	11.3	10.5	10.0
7	31.5	31.0	30.0
8	18.5	18.0	17.0
9	12.3	11.8	11.0
10	13.8	11.5	11.0
11	14.2	11.2	12.8
12	12.2	8.0	10.0
13	12.8	11.6	12.5
14	12.0	10.4	10.0
15	12.2	11.4	11.0
16	11.2	9.4	9.6

No. de muestra	Tec. de <u>"Bonsnes y Tausky"</u>	Tec. Cinética de <u>"Larsen"</u>	Tec. Adsorción de <u>"Owen"</u>
17	14.8 mg/dl	13.8 mg/dl	14.0 mg/dl
18	15.0	14.0	14.7
19	22.4	18.0	22.0
20	7.2	7.0	6.7
21	8.0	7.9	7.8
22	12.2	12.2	12.0
23	4.2	3.3	3.0
24	3.2	3.25	3.0
25	12.8	11.8	11.0
26	8.5	8.4	8.0
27	12.0	11.6	10.6
28	24.0	17.0	21.1
29	15.0	13.2	13.0
30	4.2	4.0	3.7
31	13.5	12.2	9.0
32	11.8	10.5	10.0
33	11.8	11.6	11.5
34	19.0	18.0	18.0
35	18.8	18.7	16.6
36	11.4	11.0	10.5
37	14.0	11.5	11.2
38	10.0	9.5	9.0

No. de muestra	Tec. de "Bonsnes y Tausky"	Tec. Cinética de "Larsen"	Tec. de adorción "Owen"
39	12.2	12.0	11.6
40	2.8	3.0	2.4
41	3.0	2.6	1.6
42	14.5	14.0	13.8
43	9.7	9.4	8.6
44	6.6	5.9	5.8
45	9.3	8.5	9.2
46	19.0	18.5	18.0
47	2.5	2.0	1.8
48	2.4	2.0	1.8
49	12.9	12.5	11.6
50	3.5	3.5	3.6

Evaluación estadística de los resultados obtenidos en la determinación de creatinina en suero de pacientes con alteración renal. (Considerando valores de 2.5 a 30.0 mg/dl). Las medidas estadísticas calculadas fueron; media (\bar{x}), desviación estandar (D.S.) y coeficiente de variación (C.V.)

$$\bar{x} = \frac{n_1 + n_2 \dots n_n}{n}$$

$$D.S. = \sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$C.V. = \frac{D.S. \times 100}{\bar{x}}$$

Tec. (punto final)

Tec. Cinética

Tec. Adsorción

" Bongnes y Tausky"

" Larsen"

" Owen"

\bar{x} = 12.2

11.2

10.8

D.S.= 6.55

5.91

6.0

C.V.= 53.6 %

52.76 %

55.5 %

Resultados obtenidos en la determinación de creatinina en orina de pacientes que acuden a consulta externa en la Unidad de Medicina Familiar No. 18 y hospitalizados en el Hospital General de Zona No. 24 del I.M.S.S.

La lectura de los problemas se realizó en espectrofotómetro Coleman Jr. 11 6/35 y 6/20 a una longitud de onda de 490-nm.

No. de muestra	Tec. (punto y final) <u>"Bonsnes y Tausky"</u>	Tec. Cinética <u>" Larsen "</u>	Tec. Adsorción <u>" Owen "</u>
1	70.0 mg/dl	68.0 mg/dl	65.0 mg/dl
2	85	82	80
3	70	65	60
4	68	65	65
5	62	60	60
6	59	57	53
7	60	59	58
8	130	100	90
9	86	80	78
10	45	38	41
11	40	40	35
12	125	110	115
13	110	110	90
14	40	38	35
15	43	35	40

No. de muestra	Tec. "Bonsnes y Tausky"	Tec. "Larsen "	Tec. "Owen"
16	110	110	85
17	85	82	80
18	110	110	95
19	82	80	75
20	35	30	22
21	15	11	10
22	75	72	70
23	45	42	40
24	28	20	25
25	55	50	50
26	80	80	85
27	68	65	70
28	38	35	40
29	42	40	36
30	35	32	30
31	21	20	18
32	65	63	60
33	150	152	140
34	120	115	100
35	58	62	60
36	110	100	97

No. de <u>muestra.</u>	Tec. <u>" Bonnes y Tausky"</u>	Tec. <u>" Larsen"</u>	Tec. <u>" Owen"</u>
37	65	60	58
38	32	28	25
39	55	53	50
40	65	65	70
41	70	68	65
42	81	81	78
43	66	62.5	62
44	65	62	60
45	46	43.5	45
46	56.5	49	50
47	59.2	56	62
48	42	38.5	35
49	39	36	32
50	72	69	71

Evaluación estadística de los resultados obtenidos en la determinación de creatinina en orina de pacientes con y sin alteración renal.

Las medidas estadísticas calculadas fueron:

media (\bar{x}), desviación estandar (D.S.) y Coeficiente de variación (C.V.)

Tec. (punto final)	Tec. Cinética	Tec. Adsorción
<u>"Bonsnes y Tausky "</u>	<u>"Larsen"</u>	<u>" Owen "</u>
\bar{x} = 66.6	59.1	60
D.S. = 29.5	26.23	25.9
C.V. = 44.37 %	44.38 %	43.20 %

PRUEBA DE SIGNIFICANCIA
PRUEBA DE "t" PARA MEDIDAS RELACIONADAS

$$t = \frac{x_1 - x_2}{\frac{\sum D^2 - (\sum D)^2 / N}{N(N-1)}}$$

SUERO DE PACIENTES SIN ALTERACION RENAL

(Considerando valores de 0.5 a 1.5 mg/dl)

<u>Tec. Bonsnes/Taussky</u> <u>Vs. Cinética</u>	<u>Tec. Bonsnes/Taussky</u> <u>Vs. Owen</u>	<u>Tec. Cinética</u> <u>Vs. Owen</u>
3.75	6.0	3.47
3.75 > 2.7 , sí hay dife rencia significativa al 1% de significancia(2.7) entre la Tec. de Bonsnes Tausky y la Cinética.	6.0 > 2.7 , sí hay dife rencia significativa al 1% de significancia (2.7) entre la Tec. de Bonsnes/Taussky y la de Owen.	3.4 > 2.7, Sí Hay diferencia signi- ficativa al 1 %-- de significancia-- (2.7) entre la -- Tec. Cinética y la de Owen.
Diferencia	Diferencia	Diferencia
1.05	3.3	0.77

SUERO DE PACIENTES CON ALTERACION RENAL.

(Considerando valores de 2.5 a 30.0 mg/dl)

Bonsnes/ Taussky <u>Vs. Cinética</u>	Bonsnes-Taussky <u>Vs. Owen</u>	Cinética <u>Vs. Owen.</u>
1.34	2.46	0.6811
1.34 < 2.7, No hay dife rencia significativa en tre Bonsnes/Taussky y - Cinética al 1% de signi ficancia (2.7) en valo res anormales.	2.46 < 2.7, No hay diferencia signifi cativa entre Bons-- nes/Taussky y Owen- al 1% de significan cia (2.7) en valo-- res anormales.	0.68 < 2.7, No - hay diferencia - significativa-- entre Cinética y Owen al 1% de -- significancia--- (2.7) en valores anormales.
diferencia = 1.36	diferencia = 0.24	diferencia= -2.0

SUERO DE PACIENTES CON Y SIN ALTERACION RENAL

(Considerando valores normales y anormales (0.5-30.0mg/dl)

4.01	8.12	3.5
4.01 > 2.7, Sí hay dife rencia significativa al 1% de significancia en tre B.T. y Cinética.	8.12 > 2.7, Sí hay diferencia signifi cativa al 1% de -- significancia entre B.T. y Owen.	3.5 > 2.7, Sí hay diferencia signi- ficativa al 1% de significancia en- tre Cinética y -- Owen.

MUESTRAS DE ORINA DE PACIENTES CON Y SIN ALTERACION RENAL:

Bonsnes/ Taussky

Bonsnes/ Taussky

Cinética

Vg. CinéticaVg. OwenVg. Owen.

t= 13.97

t = 7.85

t= 1.18

3.97 > 2.7. Sí hay
diferencia significativa
al 1% de significancia
(2.7)

7.85 > 2.7, Sí hay
diferencia significativa
al 1% de --
significancia (2.7)

1.18 < 2.7. No -
hay diferencia -
significativa al
1% de significan
cia (2.7)

RESUMEN:

	<u>Bonsnes/ Taussky</u>	<u>Cinética</u>	<u>Owen</u>
SUEROS "NORMALES"			
x	0.98	0.89	0.82
D.S.	0.22	0.25	0.26
C.V.	22.9 %	28.1 %	32.4 %
SUEROS " ANORMALES"			
x	12.2	11.2	10.8
D.S.	6.55	5.91	6.0
C.V.	53.6 %	52.7 %	55.5 %
SUEROS " NORMALES Y ANORMALES"			
x	6.73	6.18	5.84
D.S.	3.38	3.08	3.13
C.V.	38.2 %	40.4 %	43.9 %
MUESTRAS DE ORINA (NORMALES Y ANORMALES)			
x	66.6	59.1	60.0
D.S.	29.5	26.3	25.9
C.V.	44.37 %	44.38 %	43.2 %
PRUEBA DE SIGNIFI-	<u>Bonsnes/Taussky</u>	<u>Bonsnes/Taussky</u>	<u>Cinética</u>
CANCIA, PARA MEDI-	<u>Vs. Cinética.</u>	<u>Vs. Owen</u>	<u>Vs. Owen.</u>
DAS RELACIONADAS--			
(al 1 %)			
"t" de Student			
SUEROS "NORMALES"	sí	sí	sí
SUEROS "ANORMALES"	no	no	no
SUEROS " ANORMALES			
Y NORMALES "	sí	sí	sí
ORINA (NORMALES Y			
ANORMALES)	sí	sí	no

COEFICIENTE DE CORRELACION " r "

	"Bonsnes/Taussky" <u>Vs. Cinética</u>	"Bonsnes/Taussky" <u>Vs. "Owen"</u>	"Owen" <u>Cinética</u>
Sueros "normales" (pacientes sin- alteración renal)	0.839	0.85	0.92
Sueros "anormales" (pacientes con - alteración renal)	0.9668	0.9838	0.972
Orinas (normales y anormales)	0.9862	0.9707	0.98

C A P I T U L O V I

D I S C U S I O N.

En el trabajo realizado se eligieron los tres métodos ya descritos debido a la diferencia en su metodología, sin embargo presentan el mismo fundamento basado en el principio de Jaffé (creatinina + picrato alcalino \longrightarrow complejo amarillo-naranja (de estructura aún no establecida) (con máxima absorción a 490 nm) .

Así el método de " Bonsnes y Tausky" colorimétrico de punto final que es el más comúnmente usado en el laboratorio de rutina, se analizó efectuando curvas de calibración con estándares primarios y sueros control observándose que a bajas concentraciones la absorbancia es mínima y a medida que aumenta la concentración dicha absorbancia no es proporcional, obteniéndose una curva cerrada casi plana (gráfica No. 3)

Se prefiere utilizar suero o plasma a sangre total, --- pues durante el tiempo de reacción intervienen cromógenos no específicos presentes en los glóbulos rojos(aparte de los que intervienen en la reacción) que también dan el complejo colorido--amarillo. Esto coincide con los resultados obtenidos, pues los valores de creatinina fueron mayores por éste método que por el cinético y el de adsorción.

Este método requiere desproteinización y un tiempo de reacción de 15 minutos, máxima absorbancia a 490 nm. y una estabilidad de reacción de 15 minutos, ya que el aumento de color es proporcional al tiempo transcurrido.

Si no se puede determinar enseguida de extraída la muestra, es necesario congelarse ya que a temperatura ambiente se --
llevan a cabo reacciones que van a modificar los valores reales--
de la creatinina. Esto se comprobó efectuando determinaciones --
6 hrs. después a muestras dejadas a temperatura ambiente las cua--
les presentaron un incremento de los valores obtenidos en la pri--
mera determinación luego de extraída la muestra.

En éste método los valores de referencia reportados en--
la literatura, incluyen cromógenos no específicos. Esto se cono--
ce gracias a estudios efectuados en el producto de la reacción--
en donde se encontraron además de picrato de creatinina otros --
compuestos no conocidos exactamente, pero cuya posible estructu--
ra han presentado " Greenwald" y " Janovsky" (expuesto en el --
cap. No. II) (33).

En el método de adsorción de " Owen" con el reactivo de
"Lloyd" (silicato de aluminio), se presentaron varios problemas;
el primero fué que dicho silicato no adsorbía completamente la--
creatinina, pues al efectuar una prueba de recuperación determi--
nando creatinina en el líquido sobrenadante(por el método de --
" Bonsnes y Tauussky")se encontró creatinina presente . Este --
problema se corrigió al utilizar silicato de aluminio g.p. grado
reactivo que adsorbe completamente la creatinina.

Se requiere mucho cuidado al efectuar la adsorción y --
elución de la creatinina, ya que se pueden perder cantidades en--

éstas operaciones.

Por éste método se efectuaron curvas de calibración con estandares primarios y sueros control, obteniéndose buena linealidad en la curva (graf. No. 5), reproducibilidad en los resultados, estabilidad de reacción de 20 min. y máxima absorban--cia entre 490 y 500 nm. pero resulta ser un método muy laborioso y delicado no recomendado para trabajo de rutina. Los resultados obtenidos por éste método fueron bajos comparados con los obteni--dos por el método Cinético y el de "Bonsnes y Tausky", lo cuál era de esperarse pues la metodología y los reactivos utilizados, hacen de éste el método más exacto de referencia.

Para el método Cinético de " Larsen" se efectuó el primer ensayo en base a la bibliografía consultada, obteniéndose re--sultados no muy satisfactorio (graf. # 7) seguramente debido a que ésta técnica no contempla el uso de una solución reguladora de pH que presenta cambios durante la reacción, siendo un pará--metro importante influyendo en la velocidad de reacción, en la--elaboración de la solución y así mismo la intensidad de la colo--ración del picrato aumenta, si el pH disminuye (8), por esta ra--zón se decidió a introducir una solución reguladora de pH alcali--no que evite las variaciones de éste. Así se preparó una solu --ción NaHCO_3 50 mM/l (9) que se introdujo a la reacción dando un--pH inicial de 9 y que se alcalinizó al adicionar el NaOH 0.32 N--a 11.5, no sufriendo modificación al adicionar el suero y dismi--

nuyendo un poco con el ácido pícrico a 11.4.

Al observar que ésta solución no regulaba satisfactoriamente el pH, se aumentó su concentración a 0.2M, consiguiéndose la estabilidad del pH y mejorando notablemente la linealidad de la curva y sensibilidad del método. (graf. No. 8).

Al investigar los métodos existentes en el comercio, se informó que Labs. " Lakeside", posee un equipo para determinación cinética de creatinina en suero y orina pero no cuenta con sol.reguladora de pH.

Los Labs. " Merk", también cuentan con un método cinético y sí utilizan sol.reguladora de pH a base de fosfatos. Se ensayó dicho método obteniéndose resultados satisfactorios (graf. No. 9)

En otro ensayo se cambió la sol. reguladora por la de NaHCO_3 (que es la que se había venido usando en éste trabajo), así mismo el orden de reactivos, pues según G.Vanzetti P.en su estudio sobre un "Método cinético directo para la determinación de creatinina en líquidos biológicos" (16), es mejor recibir el suero en una sol. amortiguadora alcalina e iniciar la reacción con ac. pícrico. También se aumentó la concentración de NaOH de 0.32 N a 0.6N, aumentando y estabilizando el pH.

Según D. Grafmeyer y colabs. en su estudio sobre "Microdeterminación de creatinina en líquidos biológicos" (11) menciona que la concentración de ác.pícrico influye en la intensi-

dad de la coloración y la velocidad de reacción disminuye con su aumento. Inicialmente se estuvo trabajando con una sol. de ac. pícrico de 1.2%, pero con fines de adaptarse a la disponibilidad de reactivos en donde se realizó éste trabajo (I.M.S.S.), se cambió a 1%, lo cuál no modificó los resultados hasta entonces obtenidos. (Gráfica No. 6).

Otro parámetro importante en el método Cinético es la;

TEMPERATURA:

Ya que la intensidad de la coloración es función de la temperatura, por lo tanto es imperativo medir la cinética de -- reacción a temperatura constante(11). Sin embargo se observó en la práctica que no es necesario utilizar un baño a temperatura- constante (entre 28 y 37°C), ya que sacando los reactivos del- refrigerador 1/2 hora antes de iniciar la reacción y dejándolos a temperatura ambiente (entre 15 y 28°C) en la Ciudad de México) se estabiliza así la temperatura de problema y reactivos evitando que éste parámetro influye negativamente en la reacción.

Esto se comprobó efectuando determinaciones con reactivos a baja temperatura (recién sacados del refrigerador, a 3°C) y se obtuvieron resultados muy bajos en comparación con los ob- tenidos 1/2 hora después cuando la temperatura de dichos reactivos y muestra problema, era la del medio ambiente.

TIEMPO:

Debido a que se trata de una reacción cinética, éste--

parámetro es muy importante ya que varía según el pH y la temperatura así como con el aparato utilizado para su lectura, ya que en la bibliografía consultada se utilizaron aparatos automáticos con termostato de temperatura constante integrado, lo cual hacía que la reacción se llevara a cabo en menor tiempo (de 1 a 2 minutos). Sin embargo como en el presente trabajo se utilizaron espectrofotómetros comunes en el laboratorio de rutina, durante éste tiempo (1-2 min.) no se registraba ningún cambio en la reacción por lo que fué necesario alargar el tiempo de reacción adaptándolo al equipo utilizado.

Así se efectuaron diferentes ensayos en espectrofotómetros; Coleman Jr. II 6/35 y 6/20 y en el Hitachi Perkin Elmer, midiendo la cinética de reacción desde el minuto 0 hasta el 20, trazándose gráficas a diferentes tiempos y observando que el primer cambio en la absorbancia se lleva a cabo antes del primer minuto y 5 minutos después de la primer lectura. En éstas condiciones la gráfica trazada (graf. No. 6) se obtiene con una linealidad satisfactoria.

En el espectrofotómetro semiautomático Beckman mod.42, también se efectuaron diferentes ensayos. Aquí la cinética de reacción se registra desde los 30 segundos y la segunda lectura se lleva a cabo a los 2 minutos. (graf. No. 15)

LA LONGITUD DE ONDA:

Según D. Grafmeyer (11) y G. Vanzetti (16), el máximo-

de absorción de picrato de creatinina está entre 490 y 520 nm.- En el presente trabajo se utilizó 490 nm., porque el espectro de absorción efectuado en nuestros aparatos, indicó ésta como máxima absorción (graf. No. 1).

Así los resultados obtenidos por el método cinético,-- fueron intermedios entre " Bonsnes y Tausky" y el de " Owen",-- lo que era de esperarse, pues no siendo el cinético tan específico como el de "Owen" nos dá valores comparables.

En el análisis estadístico de los resultados observamos que con sueros "normales"(0.5-1.0 mg/dl), la D.S. es menor en "B.T." que en Cinética y "Owen", probablemente que por tratarse de pequeñas cantidades se manifiestan más las pérdidas de creatinina que pueden ocurrir en el método de adsorción.

El. C.V., resulta ser mayor en el método Cinético que en "B.T." y menor que en "Owen", debido posiblemente a que dicho método cinético tiene menor sensibilidad que el de "B.T." y "Owen" cuando se trata de analizar cantidades pequeñas como es el caso de sueros de pacientes sin alteración renal (normales).

En sueros de pacientes con enfermedad renal(anormales) (de 2.0-35 mg/dl) la D.S. y C.V. en Cinético es menor y semejante a "Owen" que los obtenidos por "B.T." que presentan mayor -- D.S. y C.V.

En las muestras de orina que representan valores elevados de creatinina, se obtuvieron valores muy semejantes a los--

de sueros "anormales".

En cuanto a la diferencia significativa (al 1% de significancia) en sueros de pacientes sin alteración renal (normales), sí existe, probablemente a que éstos métodos aunque son semejantes en su fundamento, difieren en su metodología y a pesar de que "Owen" se considera el método de referencia por ser el más exacto, presenta diferencia significativa con el método Cinético considerado más exacto(según resultados obtenidos y bibliografía consultada) que el de "B.T.", debido probablemente a la pérdida de creatinina durante la elaboración de éste método de adsorción.

Esta diferencia es mayor entre "B.T." y "Owen" que entre "B.T." y "Cinética".

Aplicando el Coeficiente de Correlación, se encuentra que existe una buena correlación entre los 3 métodos, lo cual se explica igualmente por el hecho de que el fundamento de los 3 métodos es el mismo (reacción de Jaffé)

Se observa también que el método Cinético, ofrece mayores ventajas.

CAPITULO VII

COCLUSIONES.

El método de Bonsnes y Taussky, aunque no es completamente específico, es adecuado para fines prácticos. Es conveniente usar suero o plasma a sangre total, por la presencia de sustancias crógenas en los glóbulos rojos. La estabilidad de la reacción es de 15 minutos, ya que después el color se desvanece lentamente, por eso ha de leerse dentro de éste tiempo.

La máxima absorción que se observó fué de 490 nm.

El pH óptimo para la conversión hidrolítica de creatina a Creatinina, se controla por la cantidad y concentración de ac. pícrico.

El método de adsorción de Lloyd, es más específico y exacto, pero muy complejo en su desarrollo, pues es más largo, requiere mayor cantidad de reactivos y existe el riesgo de perder creatinina en la elución pues no siempre se recupera totalmente. Su estabilidad es de 20 minutos y su máxima absorción es entre 490 y 500 nm.

El método CINETICO, presenta múltiples ventajas sobre los dos anteriores:

- Requiere menor cantidad de muestra.
- No requiere desproteínización.
- Es más rápido, lo cuál es importante en caso de urgencias.
- Debido al rápido transcurso de la reacción entre la creatinina y el ac. pícrico, no interfieren reacciones

secundarias que se inician más tarde, por lo tanto:

-El método es más específico.

-Es un método simplificado, pues no requiere de material sofisticado ya que se puede adaptar manualmente.

Los cuidados que se deben tener en su elaboración son mínimos;

-Mantener el pH constante que se logra con el uso de una solución reguladora.

-La proteína influye en la velocidad de reacción bloqueando la unión con el ión picrato, por lo tanto es importante disminuir al mínimo la influencia de ésta, limitando la cantidad de suero. Una dilución 1:11, da valores aceptables.

-La longitud de onda puede ser entre 490 y 520 nm (aunque se comprobó que la máxima fué de 490 nm)

-La temperatura debe ser constante por lo que es necesario tener los reactivos a temperatura ambiente.

-El tiempo de reacción debe ser exacto, por lo que varía según el aparato utilizado. Así el analista no podrá efectuar más de una determinación a la vez (que le tomará un total de 6 minutos). Es necesario un reposo de cuando menos 15 segundos antes de efectuar la primera lectura, para eliminar interferencias de compuestos de reacción rápida (como la cetona-acetato).

-Se observan resultados lineares finos, arriba de 15 --
mg/dl.

Por lo tanto se podría concluir que el método CINETICO
adaptado manualmente a los requerimientos del laborato
rio clínico de rutina, cumple con los objetivos pro --
puestos en éste trabajo.

C A P I T U L O V I I I .

R E S U M E N .

Se evalúan tres métodos para la determinación de creatinina en suero y orina:

- 1.- Método de " Bonsnes y Taussky" colorimético de punto final.
- 2.- Método de " Owen", adsorción de " Lloyd" con silicato de aluminio.
- 3.- Método de " Larsen", mide la cinética de la reacción.

Se analizan y ensayan diferentes métodos cinéticos.

Según información teórico-práctica obtenida, se adapta un método CINETICO MANUAL directo para la determinación de creatinina en suero y orina.

Se cuantifica la creatinina por los tres métodos en 50-muestras de pacientes sin alteración renal y 50 muestras de enfermos con alteración renal, así como muestras de orina.

Se comparan y evalúan estadísticamente los resultados.

Los valores obtenidos por el método cinético, resultan intermedios entre " B.T." y " Owen"

El método CINETICO resulta ser más simplificado que los otros dos métodos analizados, pues presenta grandes ventajas sobre ellos, comprobándose su efectividad.

REFERENCIAS.

BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- A. M. Gachon et B. Dastugue
Adaptación en microméthode d' une technique cinétique manuelle de dosage de la creatinine. Comparaison avec une technique automatique.
Ann. Biol. Clin. 36, 79-83 (1978).
- 2.- Ad.S. Olansky and Stanley N. Deming
Automated development of a kinetic method for the continuous flow determination of creatinine.
Clinical Chemistry Vol 24, No. 12, (1978).
- 3.- Abe, T. Interaction of picric acid with sodium hydroxide in water. Nature, 187, 234-35 (1960)
- 4.- Archibald R.M.
Reaction of creatinine with alkaline picrate.
J. Biol. Chem. 237, 612 (1962).
- 5.- Benyusak S., Kocsis M, Subak, Schndler J.
Interference of bilirubin in the kinetic Jaffé reaction
J.Clin. Chem, Clin. Biochem., 19 (8) 611 (1981)
- 6.- Bonsnes R.W. y Tausky H.J.
On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffé reaction. J. Biol. Chem. 158-581 (1945)
- 7.- Bowers, L.D.
Kinetics serum creatinine assays. The role of various factors in determining specificity.
Clin. Chem 26 (5) 551-54 (1980)
- 8.- Butler, A.R. The Jaffé reaction. Identification of the coloured species. Clin. Chim. Acta 59, 227-32 (1975).
- 9.- Colowich, Kaplan
Methods in Enzymology, Preparation of buffers.
Academic Press Inc. 143-44 (1955)
- 10.- Crowe L. R. and Hatch, F.E.
Evaluation renal function. Current status of clinical test. Postgrad. Med. 62, 58-67 (1977).
- 11.- D. Grafmeyer. R. Cohen et A. Badinand
Microdetermination de la creatinine dans les liquides biologiques par des méthodes cinétiques
Ann. Biol. Clin. 34, 283-89 (1976).

- 12.- Dick Heinegard and Gunnar Tiderstrom
Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method.
Clinica Chimica Acta, 43, 305-10 (1973)
- 13.- Eugene L. Grant, Richard S. Leavenworth
Control estadístico de calidad.
Ed. C. E. C.S.A. 51-53 (1981)
- 14.- Fabin, D.L. and Erttingham G.
Automated reaction rate. Method for determination of serum creatinine with the Centrifichem.
Clinical Chemistry 17(8), 696-700 (1971).
- 15.- Fabila Carrera Gilberto
Planeación y análisis experimentos
Laboratorios de fomento industrial. (1982)
- 16.- G. Vanzetti Primatio Prof.
Metodo Cinetico diretto per la determinazione de lla creatinina del liquidi biologici
Quad. Sclavo Diagn. 1^o, 2, (1974).
- 16.- Guevara, A; Sobre la valoración clínica de la función renal, Rev. Mex. de Lab. Clin. XI, I, 3-10 (1959).
- 17.- Greenwald L. Chemistry of Jaffé reactions for creatinine
J.A.M. Chem. Soc. 47, 1443-47 (1925)
- 18.- Giornale Italiano di Chimica Clinica
Organo Officiale de lla Soc. Ital. di Bioch. Clin.
Vol. 5 No. 4, 477 (1980)
- 19.- H. Bartels, M. Bohmer y C. Hererli
Serum Kreatininbestimmung ohne enteiwessen
Clin. Chim. Acta, 37-193-97 (1972).
- 20.- Henry Richard J; Cannon Donald D;
Chinical Chemistry. Principles and Technics
2a. Ed. 543-52 (1974).
- 21.- Iovine Selva
El Laboratorio y la clínica.
2a. Ed Panamericana pg. 182-87 (1979)
- 22.- Jack and Robert E. Wenk
Simple rapid kinetic method for serum creatinine measurement. Clinical Chemistry 18, 1419 (1972).

- 23.- James L. Bruning B.L. Kintz
Computational handbook of statios
2a. Ed. Scott Foresman and Company 13-16 (1979).
- 24.- Kammeraat C.
Modification of the alkaline picrate assay for creatini
ne to prevent spuriously elevzted values by ketoacids.
Clin..Chim. Acta. 84/1-2 119-128 (1978)
- 25.- Knud Larsen
Creatinine assay by reaction -kinetic principle
Clin. Chim. Acta, 41 207-17 (1972)
- 26.- Knud Larsen
Creatinine assay in presence of protein with LEB 8600
reaction rate analyser.
Clin. Chim. Acta. 40, 207-09 (1972)
- 27.- Levinso n A. Samuel y Mc. Fate R.P.
Diagnóstico Clínico del Laboratorio.
7a. Ed. El Ateneo 195, 311, 510, 1033 (1969)
- 27' Lehninger Albert L.
Bioquímica, Ed. Omega pg. 633 (1972)
- 28.- Lynch Raphael Meller
Métodos de Laboratorio. 2a. Ed. Panam. 97-122 (1972).
- 28' Owen, J. A.,
The determination of creatinine in plasma or serum and
in urine. A critical examination.
Biochem J. 54, 426-37 (1954)
- 29.- P. Bonvicini
Efecto del detergente en el método cinético de Jaffé
para la determinación de creatinina.
Gionale Italiano di Chimica Clinica
Biochim. Clin. Vol. 5 No. 4, 477 (1980)
- 30.- Szasz G; Borneru; Busch.
Enzymatic assay of creatine in serum comparison with
Jaffé methods.
J. Clin. Chem., Clin. Biochem. 17, 11 (1979).
- 31.- Sulochana G; Parthiban T.M.
Alkatonuria and endogenous creatinine clearance.
Biochem. Coll. Tamilnadu India. 41/11 (1977).

- 32.- Sheshadari Narayanan and Harold D.A.
Creatinine; A. Review.
Clin. Chem. Vol. 26 No. 8, 119-26 (1980)
- 33.- Tietz Norbert W.
Química Clínica Moderna. Ed. Interamericana 747-50 (1972)
- 34.- Todd and Sanford.
Diagnóstico Clínico por el Lab. 6a. Ed. pg-106 (1972)
- 35.- Tedesco F.J., H.R. and Alpers, D.H.
Serum amylase determination and amylase to creatinine clearance ratios in patients with chronic renal insufficiency. Gastroenterology 71, 594-98 (1976)
- 36.- Von E. Knoll, F.C. Rebel
Cinetic Creatinine determination with Gensaec-fast analyzer, comparison with Fullers method.
J. Clin. Chem, Clin. Biochem. Vol. 16, 239-44 (1978).
- 37.- Vedesco S; Rud C. Place J.F.
Routine Creatinine determination an equilibrium technique involving reusable cation exchange membranes.
Scand, J.C. Lin. Lab. Invest. (Norway) 34/3, 275-81 (1974).
- 38.- Van Stekelenburg G.J.; Valk C; Van Kamp J.S.
A new automated method for to determination of true creatinine in serum by means of the Chentrifichem centrifugal analyzer.
Clin. Chim. Acta. 89/1, 79-82 (1978).
- 39.- Wedall T. Caraway and C.W.K.
Chemical interference by drugs and eather substancia with clinical laboratory test precedures.
Clin. Chim. Acta. 41, 395-434 (1972).
- 40.- Weatherburg M.N. Trotman R.B.B.; Jackson S.H.
Specific method for serum creatinine determination based on Ion cromatography and automated alkaline picrate reaction.
Clin. Biochem. 11(4), 159-66 (1978)

- 41.- Winkler A.W., and Parra J.
Measurement of glomerular filtration. Creatinine sucrose and urea clearances in subjects without renal disease. J. Clin. Invest. 16, 869-71 (1937)
- 42.- Waljer M.S. Urinary free in hydroxycorticosteroid creatine ratios and index adrenal function.
Ann. Clin. Biochem. 14, 203-06 (1977).
- 43.- Scheffl- Bioestadística
Fondo Educativo Interamericano, Coeficiente de correlación (r) 166-70 (1979).
- 44.- Benedict S R., and Behre J.A ,
Some applications of a new color reaction for creatinine
J. Biol. Chem. 114:515 (1936)
- 45.- Woo J; Treuting J; and Cannon D.C
Diagnosis and management by Laboratory Methods,
6a. Ed. by J.B Philadelphia Vol 1 p. 263 (1979)
- 46.- Mc Lean M.H.
Evaluation of an automated creatinase creatinine procedure Clin. Chem. 19 623-25 (1973)
- 47.- Soldin S.J.
Micromethod for determination of creatinine in biological fluids by high performance liquid chromatography.
Clin. Chem 24 747-50 (1978)
- 48.- Rockerbie R.A.
Rapid determination of serum creatinine by an ion-exchange technique. Clin. Chim. Acta 15 475-79 (1967)
- 49.- Wahlefeld A.W.
Fully enzymatic method for creatinine determination a candidate for a reference method.
Clin. Chem. 26-7 (1980).