



TECO GRAM S.A.
Av. San Jorge 428 y 10ma.
Guayaquil - Ecuador
042396966 – 042397979 – 042396610
tecogram@gye.satnet.net

JUEGO DE REACTIVOS DE CREATININA (PROCEDIMIENTO DE PUNTO FINAL)

USO DIRIGIDO

Métodos cinéticos y de punto final para la determinación cuantitativa de creatinina en suero.

INTRODUCCION

La creatinina, un anhídrido de creatina, es un producto de desperdicio formado por la deshidratación espontánea de los riñones. La mayoría de la creatinina se encuentra en el tejido del músculo donde está presente como fosfato de creatina y sirve como una reserva de almacenamiento de alta energía para la conversión a ATP. Independientemente de la dieta, las concentraciones de creatinina en suero dependen casi enteramente de su nivel de excreción por los riñones. Por esta razón, su elevación es altamente específica para detectar enfermedades renales. El ensayo de creatinina ha sido basado en la reacción de la creatinina con picrato alcalino tal como lo describe Jaffe. Se han desarrollado grandes modificaciones a la reacción de Jaffe hasta llegar a un método cinético que es rápido, simple y evita interferencias. En el método de punto final, se usa el ácido acético para destruir el complejo de picrato de creatinina, lo que provoca una pérdida del color, los componentes del suero no creatino retienen sus colores derivados del picrato y así las diferencias en las absorbancias dan la concentración de creatinina. Este procedimiento ha sido modificado por Heinegard y Tiderstrom para eliminar la interferencia sin el tratamiento del ácido.

PRINCIPIO

Alkali
Creatinina + Picrato de sodio ----- >Creatinina –
Complejo de picrato

(amarillo-naranja)

La Creatinina reacciona con el ácido pícrico en condiciones alcalinas para formar un complejo de color que absorbe a 510 nm. El coeficiente de la formación del color es proporcional a la concentración de creatina en la muestra. En el método de punto final la diferencia en la medición de absorbancia después de la formación del color conduce a un valor de la creatinina corregido de sustancias que interfieren.

REACTIVOS

1. Reactivo de Acido Pícrico de Creatinina: una solución que contiene 10 mM de ácido pícrico.
2. Reactivo de buffer de Creatinina: una solución que contiene 10 mM, borato de sodio, 240 mM. Hidróxido de sodio y surfactante.
***Nota importante:** Si el reactivo buffer de creatinina ha sido sujeto a temperaturas frías, se puede formar un precipitado blanco. Caliente el reactivo a 37°C agitándolo para disolver todos los precipitados antes de usar.
3. Estándar de creatinina (5.0 mg/dl): Una solución que contiene creatinina en ácido hidroclicórico con preservantes.

PRECAUCIONES

1. Este reactivo es solamente para uso diagnóstico In Vitro.
2. El reactivo de ácido pícrico de creatinina es un fuerte agente oxidante. Evite el contacto con la piel. **LIMPIE CUALQUIER DERRAMAMIENTO, YA QUE EL ACIDO PICRICO ES EXPLOSIVO.**
3. El reactivo de buffer de Creatinina es un álcali. El ácido acético es un ácido. Evite la ingestión y el contacto.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Combine volúmenes iguales de Reactivo de ácido pícrico de creatinina y el reactivo buffer de creatinina, mezcle bien.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

1. Ambos reactivos deben ser almacenados a temperatura ambiente (18 – 25°C).
2. El reactivo combinado (de trabajo) es estable hasta por una semana.

DETERIORO DEL REACTIVO

El reactivo debe ser desechado si:

1. Ha ocurrido turbidez; la turbidez puede ser un signo de contaminación.
2. El reactivo falla en alcanzar la linealidad a la que debe llegar o falla al recupera los valores de control en el rango establecido.

RECOLECCION DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO.

1. Se recomienda el suero.

- La creatinina en suero es estable por veinticuatro (24) horas a temperaturas refrigeradas (2 – 8°C) y por algunos meses cuando se lo congela y se lo protege de la evaporación y la contaminación.
- Las muestras de orina de 24 horas deben ser preservadas con 15 gramos de ácido bórico.

- Baño/maría con gradillas.
- Tubos de ensayo/gradillas.
- Vaso para combinar los reactivos (plástico o vidrio).
- Espectrofotómetro con una cubeta de temperatura controlada.

MATERIALES PROVISTOS

- Reactivo de ácido pícrico de creatinina.
- Reactivo de buffer de creatinina.
- Estándar de creatinina.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO INCLUIDOS.

- Pipetas.
- Cronómetro.
- Rotule el frasco de la prueba, el reactivo del blanco, estándar, control, y tubos de muestras desconocidas.
- Pipetee 3.0 ml de reactivo de trabajo en los tubos de ensayo.
- Transfiera 0.1 ml (100 µl) de muestra a su tubo respectivo, agua destilada al reactivo del blanco y mezcle.
- Ponga todos los tubos a 37°C a baño maría por quince (15) minutos.
- Fije la longitud de onda del espectrofotómetro a 510 nm a ponga el instrumento a cero con el reactivo de blanco. Lea y registre la absorbancia de todos los tubos. (Rango de longitud de onda: 500 – 520 nm).
- Calcule el valor de la creatinina: Vea “Cálculos”.
 - PUEDE USAR EL CALIBRADOR MULTIPROPOSITO PARA REMPLAZAR EL ESTÁNDAR.

VOLUMENES ALTERNATIVOS

Si el espectrofotómetro que se está usando requiere de un volumen menor que 3.0 ml para lecturas precisas, use 0.05 ml (50 µl) de muestra en 1.0 ml de reactivo. Prosiga como ya se lo ha descrito.

CALCULOS

El valor de la creatinina desconocido se determina comparando su cambio de absorbancia con el valor conocido del estándar.

$$\text{mg/dl} = \frac{\text{Abs (Desconocido)} \times \text{Concentración del estándar}}{\text{Abs.(Estándar)}}$$

Donde:

Abs. = Absorbancia

Ejemplo:

| | | | |
|----|--------------------|---|------------|
| Si | Abs./Desconocida | = | 0.040 |
| | Abs./Estándar | = | 0.150 |
| | Conc. del estándar | = | 5.0 mg/dl. |

PROCEDIMIENTO (AUTOMATIZADO)

No disponible

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- Combine volúmenes iguales de Reactivo de ácido picrico de creatinina y Reactivo de buffer de creatinina. Mezcle bien.

Entonces

0.040

----- x 5.0 = 1.3 mg/dl creatinina.

0.150

LIMITES DEL PROCEDIMIENTO

La albúmina, a una concentración de 10.0 gm/dl contribuye 0.2 mg/dl al valor de la creatinina, la hemólisis moderada (0.2 gm/dl Hgb), muestras muy ictericas y lipémicas darán resultados elevados. El acetato descrito a 10 mg/dl interferirá en los resultados.

CALIBRACION

Use el estándar acuoso provisto. (También puede usar el calibrador TC – multipropósito para reemplazar el estándar.)

CONTROL DE CALIDAD

La integridad de la reacción debe ser monitoreada usando sueros de control normal y anormal con valores conocidos de creatinina.

VALORES ESPERADOS

Suero: Hombre 0.9 – 1.50 mg/dl

Mujer 0.7 – 1.37 mg/dl

CARACTERISTICAS DE LA PRUEBA

- Linearidad: 25 mg/dl.
- Comparación: Un estudio realizado entre este procedimiento y un procedimiento cinético similar condujo a un coeficiente de correlación de 0.99 con una ecuación de regresión de $y = 0.96x + 0.06$. Las muestras de suero y de control usadas en el estudio tuvieron valores que variaban de 0.9 a 8.3 mg/dl.
- Precisión:

Dentro de la corrida

| Promedio | S.D. | C.V.% |
|----------|------|-------|
| 1.9 | 0.05 | 2.6 |

8.2 0.60 7.3

De corrida a corrida

| <u>Promedio</u> | <u>S.D.</u> | <u>C.V.%</u> |
|-----------------|-------------|--------------|
| 2.0 | 0.20 | 10.6 |
| 8.0 | 0.40 | 4.6 |