OSPEDALE MAGGIORE CA' GRANDA — MILANO
LABORATORIO DI BIOCHIMICA
Primario: Prof. G. VANZETTI

METODO CINETICO DIRETTO PER LA DETERMINAZIONE DELLA CREATININA NEI LIQUIDI BIOLOGICI

L. PRENCIPE

Estratto dai «QUADERNI SCLAVO DI DIAGNOSTICA» - 1974 - Vol. 10 - Fascicolo 2

S.T.E. - Società Tipolitografica Editoriale - Città di Castello

SUMMARY

PRENCIPE L. — DIRECT KINETIC METHOD FOR DETERMINING CREATININE IN BIOLOGICAL FLUIDS.

A rapid reaction rate method for the kinetic assay of creatinine in serum and urine is described. The method is based on Jaffè reaction and does not require deproteinization: serial determinations can be performed at a rate of about 50 specimens per hour.

A rigorous control of pH, and a suitable protein content are essential for reliable results.

For serum assays, a standard creatinine solution with a protein content similar to that of serum is required: the value of a blank obtained on a similar protein solution without creatinine must be subtracted.

A delay of 15 seconds after the start of the reaction is required to suppress the interference of such fast-reacting as aceto-acetate. Linear results are obtained for concentrations of creatinine up to 15 mg/100 ml.

Interference are negligible, and analytical results show an excellent correlation with those obtained after isolation of creatinine by absorption on a cation exchange resin.

Recovery of added creatinine is about 100 %.

INTRODUZIONE

Per dosare la creatinina nei liquidi biologici si utilizza comunemente la reazione con lo ione picrato (reazione di JAFFÉ [**4**]): tale reazione peraltro è poco specifica, e i metodi basati su di essa forniscono spesso risultati discordanti.

Per rendere più attendibili i risultati si ricorre spesso alla deproteinizzazione del siero; si possono anche allontanare le sostanze interferenti estraendole con etere, ovvero si può isolare la creatinina adsorbendola su reattivo di Lloyd o su resina a scambio ionico.

Con i primi due procedimenti tuttavia non si eliminano tutte le sostanze interferenti, mentre i metodi basati sull'isolamento della creatinina sono delicati, e possono dar luogo a perdite.

Di recente, alcuni AA. hanno proposto l'impiego di metodi cinetici per il dosaggio della creatinina nei liquidi biologici senza deproteinizzazione. COOK [**2**] ha proposto un metodo cinetico manuale, i cui risultati tuttavia non concordano in modo soddisfacente con quelli del metodo di riferimento da lui utilizzato. FABINY e coll. [**3**] determinano la creatinina cineticamente su un « analizzatore centrifugo parallelo » tipo Gemsaec con risultati soddisfacenti. Non hanno eseguito però prove di recupero di creatinina. LARSEN ([**5**] [**6**]) ha proposto un metodo cinetico utilizzando un analizzatore di reazione LKB 8600.

Poiché le sostanze interferenti hanno una velocità di reazione di-

Lavoro giunto in Redazione il 22 Febbraio 1974.

QUAD. SCLAVO DIAGN., **10**, n° 2, 1974.

versa da quella della creatinina, è possibile eliminare la loro interferenza scegliendo opportunamente l'intervallo di tempo nel quale viene effettuata la misura. Vi sono però altri due fattori che vanno tenuti presenti e che possono interferire nella determinazione: si tratta del pH e delle proteine del siero.

La costanza del pH ha importanza essenziale; come è stato dimostrato da SEELIG [7], piccole variazioni del pH possono influire sulla velocità della reazione e sullo spettro di assorbimento del composto formato.

Come vedremo, le proteine del siero possono influire in due modi; influenzando la velocità di reazione della creatinina, e reagendo esse stesse con lo ione picrato. Se si vogliono ottenere risultati validi è necessario che i campioni e gli standard vengano sottoposti ad analisi in condizioni identiche di pH, ed in presenza di quantità equivalenti di proteine; è inoltre necessario sottrarre un « bianco » contenente le proteine del siero in assenza di creatinina. Se non si tiene conto di queste esigenze si è costretti a ricorrere, come ha fatto LARSEN (1972 [6]) ad appositi fattori di correzione che permettano di compensare la diversa velocità di reazione della creatinina nei campioni in esame e negli standard.

MATERIALI E METODI

Strumentazione

È stato utilizzato l'analizzatore di reazioni 8600 della LKB (Stoccolma) con il kit per il filtro a 508 nm e un « Delay-kit » regolabile fra 5 e 25 sec.

Reagenti

1) $NaHCO_3$ 50 mM

2) NaOH 0,6 N

3) Miscela diluente alcalina: mescolare prima dell'uso 50 ml di $NaHCO_3$ 50 mM e 22,7 mc di NaOH 0,6 N.

4) Acido picrico: soluzione satura 1,2 % (soluzione scatenante).

5) Siero umano privo di creatinina: si può utilizzare il siero privo di ioni « Chemvarion » della Clinton.

6) Soluzione standard concentrata di creatinina 2 mg/ml: sciogliere 20 mg esatti di creatinina pura (Merck) in 10 ml di siero privo di creatinina, e conservare a — 20°C.

7) Soluzione standard di creatinina 4 mg/100 ml: diluire 200 µl esatti di soluzione standard concentrata con 9,8 ml di siero privo di creatinina.

8) Standard di creatinina 100 mg/100 ml in acqua deionizzata; sciogliere 100 mg di creatinina pura in 100 ml di acqua deionizzata.

Condizioni operative dello strumento

— Filtro interferenziale	508 nm
— Tempo di reazione	60 sec
— Delay	15 sec
— Decorso della reazione	Incremento
— Background	0
— Velocità della carta	60 mm/min

Procedimento per il siero

Pipettare nelle apposite cuvette di polistirolo 1 ml della soluzione 3) e 100 µl di soluzione standard, e rispettivamente di siero in esame e di siero privo di creatinina (bianco). Per la diluizione si può utilizzare un diluitore automatico tipo « Micromedic ».

Calcolo

Calcolare i Δ E/30 secondi dei campioni, degli standard e del bianco con l'apposito « Template ».
Applicare la formula:

$$C_c = C_{st} \cdot \frac{\Delta E_c - \Delta E_b}{\Delta E_{st} - \Delta E_b}$$

dove E_c, E_b, E_{st} sono le variazioni di estinzione ottica nei primi 30 secondi del campione, del bianco e dello standard.

I valori di Δ E/30 secondi possono essere calcolati automaticamente con l'impiego del calcolatore elettronico di velocità di reazione LKB 8200. Per fare ciò occorre fattorizzare un canale con il valore 1,000 ed inserire il programma « Steady-state ». Nella Tabella I è riportato uno schema del metodo per facilitare l'esecuzione.

Procedimento per le urine

Pipettare nelle apposite cuvette di polistirolo 1 ml di soluzione 3), aggiungere 10 µl di urina o di soluzione standard 100 mg/ml. Seguire il metodo descritto prima per il siero. Per la diluizione si può utilizzare la pipettatrice automatica della « Micromedic ».

Calcolo

$$100 \frac{\Delta E_c}{\Delta E_{st}} = \text{mg di creatinina in 100 ml di urina.}$$

METODO DI RIFERIMENTO

Come riferimento, ho impiegato una variante del metodo di STOTEN [**8**], basato sull'assorbimento della creatinina su resina a scambio ionico: descriverò brevemente la tecnica utilizzata.

TABELLA I

Determinazione cinetica della creatinina nel siero.

SCHEMA DEL METODO

Diluizione iniziale

	Bianco	Campione	Standard	
Soluzione alcalina	1,0	1,0	1,0	ml
Bianco (Chemvarion)	0,1	—	—	»
Siero	—	0,1	—	»
Standard creatinina 4 mg/100 ml	—	—	0,1	»

Analizzatore

Filtro	508 nm
Tempo di misura	1 min
E fondo scala	0,05
Corso della reazione	Incremento
Fondo	0,0
(sol. scatenante)	100 µl sol. picrica
Ritardo	15 sec

Calcolatore

Fattore	1,000
Bottone da premere	Steady-state

Calcolo

Sottrarre ai ΔE dei campioni e degli standard il ΔE del bianco, indi applicare la formula:

$$\frac{\Delta E_c}{\Delta E_{st}} \cdot 4 = \text{creatinina mg/100 ml}$$

Reagenti

1) Sospensione di resina Dowex 50 W x 8 200-400 mesh. Lavare 20 g di resina con 200 ml di acqua deionizzata, aspirare il sovranatante e ripetere 3 volte il lavaggio. Sospendere la resina con 150 ml di acqua deionizzata.

2) Acido picrico: soluzione satura.

3) NaOH 2,5 N

4) Soluzione standard di creatinina 2 mg/100 ml in albumina 7 g/100 ml.

5) Soluzione alcalina di acido picrico: al momento dell'uso mescolare 20 volumi di acido picrico e 1 volume di NaOH 2,5 N.

Pipettare 1 ml di soluzione di resina ben agitata (tenere la sospensione in costante agitazione con agitatore magnetico), aggiungere 1 ml di siero, rispettivamente di acqua deionizzata e di soluzione standard. Agitare le provette a inter-

mittenza per 19-20 min; lasciare assorbire la creatinina, aspirare il sovranatante; lavare 2 volte con 6 ml di acqua deionizzata. Aggiungere 3 ml di picrato alcalino, agitare bene per 30 sec, lasciare sedimentare e ripetere l'operazione per altre 2 volte. Dopo 20 min leggere al fotometro l'E.O. del sovranatante a 520 nm.

VALUTAZIONE DEL METODO

Prove eseguite

Prove preliminari hanno dimostrato che non è conveniente far partire la reazione con l'aggiunta di una soluzione di picrato alcalino. La soluzione alcalina è infatti poco stabile: inoltre piccole quantità di questa soluzione possono cadere a volte sul blocco termostatico e intaccarlo formando chiazze di colore arancione. È quindi preferibile diluire in un primo tempo il siero con una soluzione tamponante alcalina, e far partire la reazione con la soluzione acquosa di acido picrico. È anche opportuno ridurre al minimo l'influenza delle sieroproteine sulla reazione cromogena, limitando la quantità di siero utilizzato. Una diluizione del siero 1 a 11 permette di ottenere valori accettabili di Δ E/30 sec, limitando l'interferenza delle sieroproteine.

Il ritardo inserito sullo strumento (15 sec) permette di eliminare la parte iniziale della reazione cromogena, che può essere influenzata dal viraggio alcalino iniziale dell'acido picrico. Il ritardo permette inoltre di eliminare l'interferenza delle sostanze che reagiscono velocemente col picrato (v. avanti). Nell'intervallo successivo di un minuto il bianco del reattivo (tampone + acido picrico) non presenta variazioni apprezzabili dell'estinzione ottica.

Nella Figura 1 riporto gli spettri di assorbimento tra 477 e 527 nm dei prodotti di reazione della creatinina con l'acido picrico: a titolo di raffronto riporto gli spettri di assorbimento dell'acido picrico con le sieroproteine. Gli spettri sono del tutto simili. La determinazione della creatinina può quindi essere eseguita indifferentemene ad una lunghezza d'onda compresa tra 490 e 520 nm; tra 500 e 510 nm si hanno con il metodo proposto variazioni di estinzione ben riproducibili anche per valori molto bassi di creatinina, come si riscontrano nei bambini di età inferiore ai 12 anni [**1**].

Linearità

Ho analizzato con la tecnica sopra descritta una serie scalare di soluzioni di uno standard puro di creatinina sciolto in acqua deionizzata con concentrazioni comprese fra 1 e 15 mg di creatinina per litro.

I risultati sono riportati nella Figura 2: ad una lunghezza d'onda

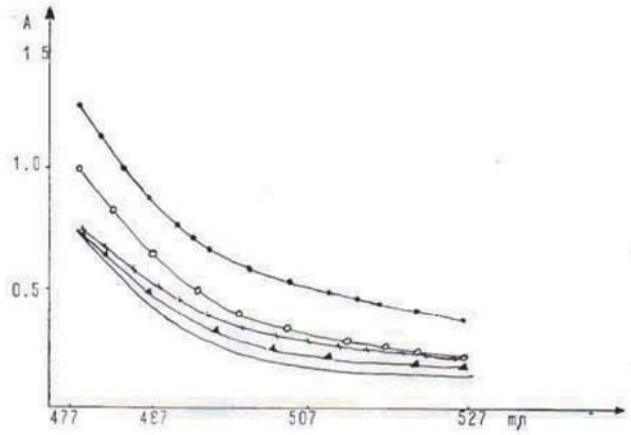


Fig. 1 — Spettro di assorbimento del prodotto di reazione tra l'acido picrico e i diversi composti.
(Beckman Acta III)
——— acido picrico <——> globuline umane x———x Chemvarion o——o albumina umana (Pentex) •———• Standard puro di creatinina in soluzione acquosa.

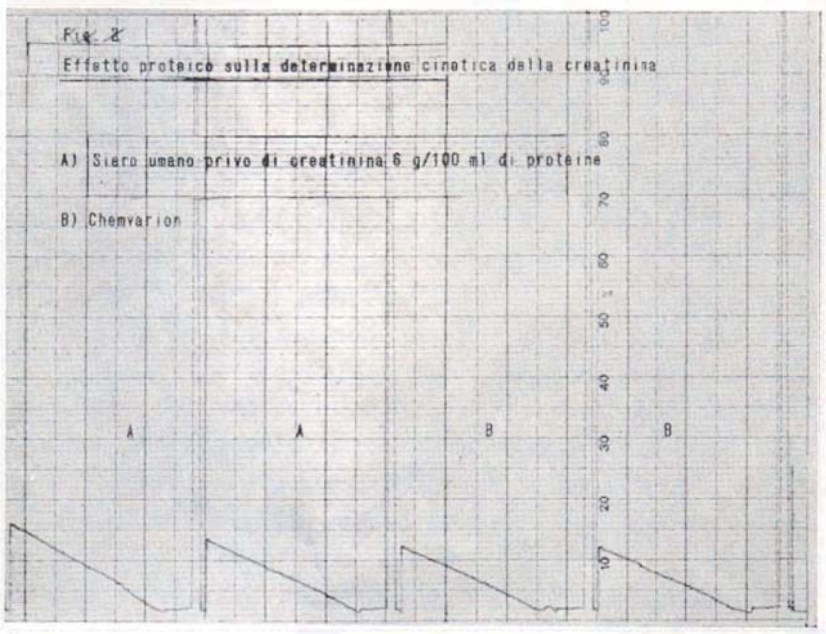


Fig. 2

di 508 nm le concentrazioni della creatinina e le variazioni corrispondenti dell'estinzione ottica sono proporzionali in tutta la gamma considerata.

Come già osservato da SEELIG [7] la cinetica della reazione è fortemente influenzata da eventuali diversità di pH esistenti tra gli standard ed i campioni, o fra gli stessi standard: prove preliminari da me effettuate in ambiente non tamponato hanno confermato questa forte influenza del pH. Ho quindi adottato la soluzione tampone di bicarbonato e NaOH proposta da COOK, introducendo direttamente nel tampone la quantità di ioni ossidrilici raccomandata da detto Autore: i risultati sono stati soddisfacenti.

Nelle determinazioni sul siero il pH dei campioni può tuttavia essere diverso da quello degli standard acquosi; le proteine esplicano infatti un effetto tampone. Data la grande sensibilità della reazione alla presenza di proteine e alle variazioni del pH ho ritenuto necessario utilizzare come standard soluzioni di creatinina in una soluzione proteica simile al siero, in modo da ridurre al minimo l'influenza delle proteine e le differenze di pH fra standard e campioni.

Ho constatato che la miscela diluente ha un pH di 13,20; dopo l'aggiunta di siero il pH scende a circa 13,15 e dopo l'aggiunta di acido picrico a circa 13,10 (misure fatte con un elettrodo Ingold HA 405). Si tratta di variazioni del pH di entità modesta, ma non del tutto trascurabili. Per le urine, ho riscontrato un comportamento lineare del ΔE fino a concentrazione di 200 mg/100 ml di urina.

Effetto delle proteine

Per valutare l'effetto delle proteine nella determinazione cinetica della creatinina è necessario disporre di soluzioni proteiche assai pure. Alcuni fra i prodotti commerciali comunemente usati non sono soddisfacenti. Il grado di purezza delle singole proteine viene infatti per lo più calcolato in base ai risultati dell'analisi elettroforetica; non vengono specificate la presenza e la concentrazione di altre eventuali sostanze, che possono interferire nella determinazione.

Usando prodotti assai puri ho trovato che il potere cromogeno dell'albumina umana con il picrato alcalino (reazione a termine) risulta circa doppio di quello delle gamma-globuline. La cinetica delle due frazioni proteiche è però molto diversa: nei primi 60 sec una soluzione di 3 g % di gamma-globuline non dà alcuna variazione di estinzione ottica. Tenuto conto di questo diverso comportamento delle varie frazioni proteiche ho ritenuto opportuno preparare una miscela di sieroproteine umane assolutamente prive di creatinina, aventi però la stessa compo-

sizione delle proteine del siero: a questo scopo ho preparato una miscela di sieri presi a caso, fra i sieri caratterizzati da un basso contenuto di creatinina ed ho sottoposto il pool di sieri, introdotto in sacchetti di cellofan, a dialisi prolungata contro acqua corrente.

Ho fatto reagire queste proteine con il picrato alcalino secondo la procedura descritta, ed ho potuto constatare che esse cominciano a reagire dopo 15-20 sec dall'aggiunta del reattivo starter: nei primi 30 sec successivi il siero dializzato contenente 6 g di proteine/100 ml dà un Δ E corrispondente a quello dato da una soluzione contenente 0,25 mg di creatinina /100 ml.

Ho ottenuto risultati analoghi con proteine umane altamente purificate (siero-albumina umana standard della Dade) e con il siero privo di ioni « Chemvarion » della Clinton.

Come risulta dalle Figure 1 e 2, le proteine del siero umano reagiscono già di per sé con il picrato alcalino, e danno un prodotto di reazione rosso che ha caratteristiche spettrali (fra 477 e 522 nm), simili a quelle del composto picrato-creatinina. La variazione dell'estinzione ottica, Δ E è proporzionale alla concentrazione delle proteine. L'eventuale denaturazione a caldo delle sieroproteine non influenza lo sviluppo del colore.

Nei casi limite, le variazioni del contenuto proteico nei diversi sieri possono essere al massimo del 50%. Poiché le gamma-globuline nell'intervallo di tempo considerato non interferiscono, e poiché il maggior contributo allo sviluppo di colore delle proteine è dato dall'albumina, le modeste differenze di composizione proteica dei diversi sieri possono essere praticamente trascurate.

Qualche Autore [**1**] ha proposto l'aggiunta di detergenti nella miscela di reazione, per mascherare l'effetto proteico. Nelle prove da me effettuate l'aggiunta di dodecil-fosfato sodico e di Tween 80 all'1 % non ha avuto alcun effetto benefico complessivo sulla reazione: si hanno solo degli aumenti di velocità di reazione, che si riflettono nello stesso modo sui campioni e sugli standard.

Prove di recupero

Nella Figura 3 ho riportato le estinzioni ottiche date da soluzioni di creatinina sciolta in concentrazioni scalari nel siero dializzato. La retta che si ottiene non passa per l'origine: ciò è dovuto all'interferenza delle proteine.

Se si sottrae il valore del bianco, la curva passa per l'origine degli assi (Fig. 3). Adottando per gli standard di riferimento condizioni analoghe a quelle utilizzate per i campioni in esame, si ha una cinetica

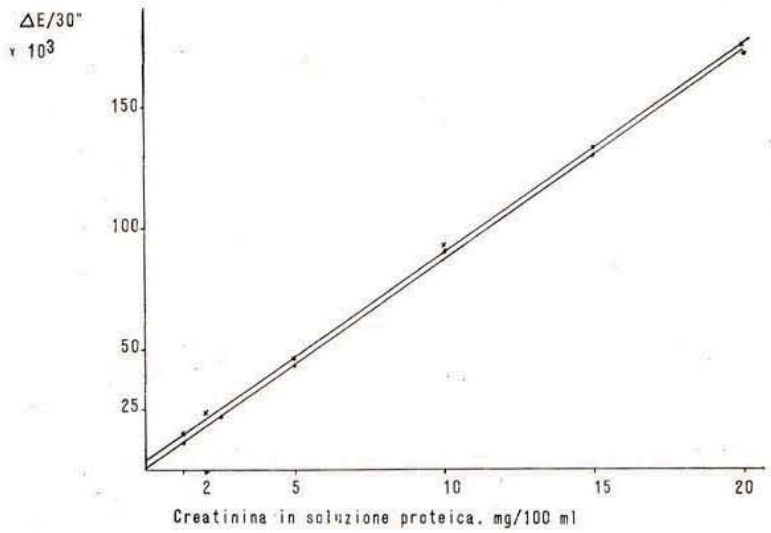


Fig. 3 — Curva di taratura per la determinazione della creatinina cinetica con creatinina in soluzione proteica.
x Δ E / misurato
. Δ E meno il valore del bianco.

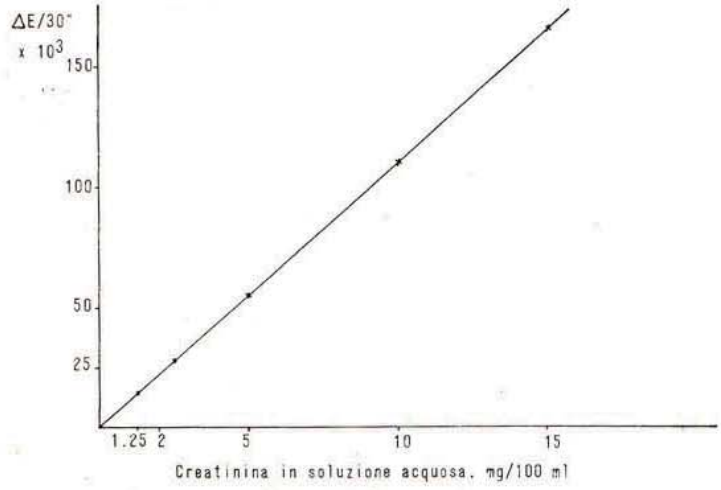


Fig. 4 — Curva di taratura per la determinazione cinetica con creatinina in soluzione acquosa.

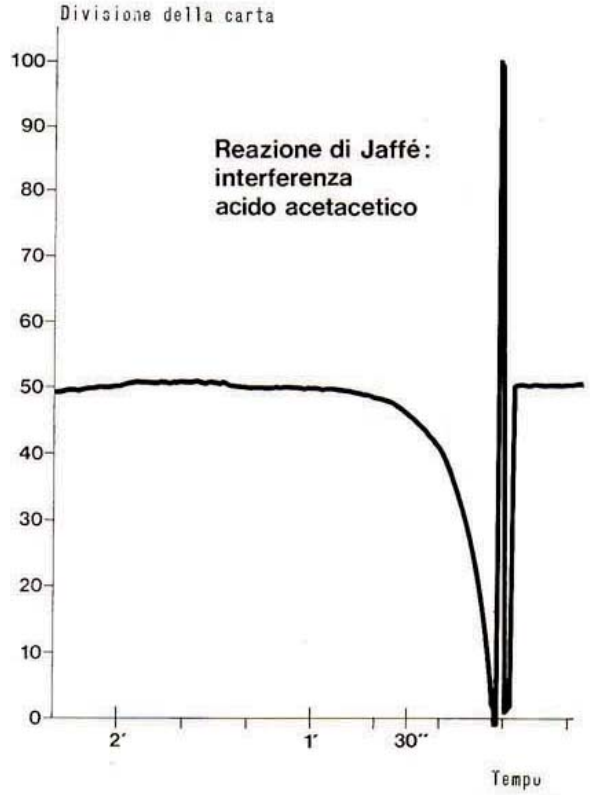


Fig. 5 — In questo tracciato si può valutare l'effetto dell'acido acetacetico a una concentrazione 10 volte superiore al valore massimo normale. La reazione si esaurisce praticamente nei primi 20 secondi.

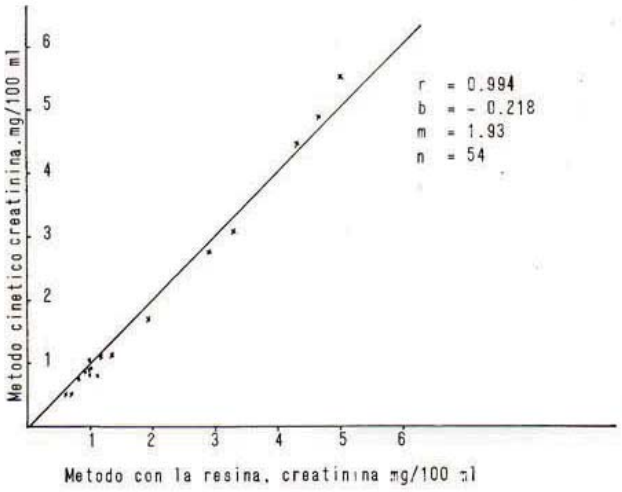


Fig. 6 — Curva di correlazione tra il metodo cinetico e il metodo con la resina per la determinazione della creatinina.

identica a quella dei campioni, e se si aggiungono quantità note di creatinina si ha un recupero del 100 %.

Se si calcolano invece i valori delle concentrazioni per confronto con soluzioni standard di creatinina in assenza di proteine si ottengono cinetiche più veloci, con valori di ΔE più elevati per gli standard (Fig. 4) e quindi valori troppo bassi, inferiori del 20 % a quelli reali per i campioni in esame. Ciò può derivare dall'azione tampone esplicata dalle sieroproteine, che provocano un abbassamento del pH e quindi una diminuzione della velocità di reazione, ovvero da una loro azione diretta sulla cinetica di formazione del complesso picrato-creatinina. Questo fenomeno ha indotto LARSEN a ipotizzare un « recupero incompleto » della creatinina aggiunta al siero: mi sembra più corretto parlare di azione di rallentamento sullo sviluppo di colore.

In definitiva, le sieroproteine esercitano una duplice azione: da un lato esse abbassano il pH e riducono la velocità di reazione: tale effetto può essere compensato grazie all'impiego di uno standard in soluzione proteica. D'altro canto la sieroalbumina forma a sua volta un complesso colorato: ciò richiede la sottrazione di un apposito « bianco ».

Effetto degli altri cromogeni

Ho esaminato l'effetto esercitato da soluzioni concentrate di glucosio e di vitamina C sulla reazione di JAFFÈ, nelle condizioni descritte. Nell'intervallo di tempo da me scelto, l'effetto di tali sostanze sulla determinazione cinetica della creatinina è risultato trascurabile.

L'interferenza dell'acetone e dell'acido piruvico a concentrazioni superiori 10 volte ai valori normali è risultata anch'essa praticamente trascurabile.

Il diagramma della Figura 5 permette di valutare l'interferenza dell'acido acetacetico ad una concentrazione 10 volte superiore al valore massimo normale. L'acido acetacetico è un tipico composto a reazione veloce; la reazione si esaurisce praticamente nei primi 25 sec. Salvo casi patologici del tutto eccezionali, se si inserisce un ritardo di 15 sec l'interferenza di questo composto è praticamente trascurabile.

Confronto con il metodo della resina

Ho confrontato i risultati ottenuti con il metodo cinetico con quelli forniti dal metodo alla resina precedentemente descritto. Il confronto è stato effettuato su 54 sieri di pazienti diversi con contenuto di creatinina variabile tra valori normali e valori fortemente elevati (sino a circa 10 volte i valori normali).

I risultati ottenuti sono riportati nella Figura 6.

Ho ottenuto un coefficiente di correlazione pari a 0.994. L'equazione della retta di regressione corrispondente (y = mx + b) è:

y = 1.093 - 0.218
m = 1.093
b = -0.218
r = 0.994

Precisione del metodo

La precisione del metodo « nelle serie » è stata valutata effettuando 24 determinazioni consecutive su un pool di sieri con contenuti di creatinina pari a circa 3 mg %.

Il coefficiente di variazione nella serie, calcolato con la nota formula, è risultato inferiore al 2 %. La riproducibilità « tra giorni », riscontrata nelle determinazioni di routine ripetute su sieri di pazienti in un periodo di tempo di 26 giorni, ha dato un C.V. di ± 5,6 %. Il C.V. di sieri di pazienti analizzati in duplicato nella stessa serie analitica in 26 giorni consecutivi è risultato pari al 4,3 %.

Conclusione

Il metodo cinetico per il dosaggio della creatinina da me messo a punto presenta sensibili vantaggi rispetto di metodi tradizionali. Il tempo di misura richiesto per ciascun campione è di soli 60 sec; la disponibilità in commercio di analizzatori di reazione permette di effettuare questo test con una cadenza di circa 50 campioni/ora, in modo automatico.

Il metodo descritto permette di dosare la creatinina su 100 µl di siero. L'impiego di soluzioni standard in presenza di sieroproteine e la sottrazione di un « bianco » dato da una soluzione proteica permettono di ottenere risultati validi corrispondenti a quelli ottenuti dopo adsorbimento della creatinina su resina a scambio ionico senza deproteinizzazione dei campioni.

La variazione dell'estinzione ottica è proporzionale alla concentrazione sino a tassi di creatinina superiori a 15 mg %. È quindi necessario ripetere la determinazione su campioni diluiti o su quantità ridotte di siero solo in casi eccezionali. Il metodo si può quindi utilizzare con vantaggio, senza prediluizione del siero, anche per i pazienti affetti da blocco renale o ricoverati nei reparti di nefrodialisi.

L'interferenza dei cromogeni aspecifici Jaffè-positivi appare trascurabile. Il metodo è stato collaudato da tempo su vasta scala per analisi

di routine con risultati assai soddisfacenti. La riproducibilità dei risultati « nelle serie » e « fra le serie » è risultata assai buona.

BIBLIOGRAFIA

1 - Bierens de Haan J. — Creatinine in serum and plasma LKB Application. *Note*, oct. 1972.

2 - Cook J. G. H. — Creatinine assay in the presence of protein. *Clin. chim. Acta*, **32**, 485-486, 1971.

3 - Fabiny D. L. and Ertinghausen G. — Automated Reaction-Rate Method for Determination of Serum Creatinine with the Centrifichem. *Clin. Chem.*, **17**, 8, 696-700, 1971.

4 - Jaffé M. — Neber den Niederschlag, welchen Pikrinsaenre in normalen Harn erzengt und neber line neue Reaktion des Kreatinins. *Z. Physiol. Chem.*, **10**, 391-400, 1886.

5 - Larsen K. — Creatinine assay in the presence of protein with LKB 8600 Reaction Rate Analyzer. *Clin. chim. Acta*, **38**, 475-476, 1972.

6 - Larsen K. — Creatinine assay by a Reaction-Kinetic principle. *Clin. chim. Acta*, **41**, 209-217, 1972.

7 - Seelig H. P. — Die Jaffé-Reaction mit Kreatinin Reaktions produkt used allgemeine Reaktionsbedingungen. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **7**, 581-586, 1969.

8 - Stoten A. — A micromethod for creatinine using resin to remove interfering substances. *J. Med. Lab. Technol.*, **25**, 240-243, 1968.