



Stanbio Direct Creatinine LiquiColor® Procedure No. 0420

Quantitative Kinetic Determination of Creatinine
in Serum or Urine

Summary and Principle

In 1886 Jaffe¹ described a method for the determination of creatinine involving a protein free filtrate and reaction with picric acid in alkaline solution. Although several methods have been described since, the classic Jaffe reaction is still most widely used. This reaction is subject to interferences by a number of substances, including protein and glucose.^{2,3,4} Modifications have been developed to combat the drawbacks.⁵ Kinetic procedures have become popular because they are rapid, simple and avoid interference. The present method is based on a modification of the automated reaction rate of Fabinay and Eringshausen.⁶

Creatinine + Picric Acid Creatine-picric acid complex

Creatinine reacts with the picric acid in alkaline conditions to form a color complex which absorbs at 510 nm. The rate of color formation is proportional to the creatinine concentration in the sample.

Reagents

Creatinine Acid Reagent, Cat. No. 0421

Aqueous solution of picric acid, 3.6 mmol/L.

Creatinine Base Reagent, Cat. No. 0422

Aqueous solution of sodium hydroxide, 240 mmol/L.

Creatinine Standard - 5 mg/dL, Cat. No. 0423

Aqueous solution of creatinine zinc chloride.

Precautions: *For In Vitro Diagnostic Use Only.*

Do not ingest. Toxicity has not been established. Care should be exercised in handling the Creatinine Base Reagent since it is caustic. Picric Acid is a strong oxidizing agent. Avoid contact with

skin. Wipe away any spills, since dry picric acid is explosive.

Reagent Preparation: Mix 1 part Creatinine Acid reagent with 1 part Creatinine Base Reagent to prepare "Working Reagent". Standard is ready to use.

Reagent Storage and Stability: Creatinine Acid Reagent, Creatinine Base Reagent and Creatinine Standard are stable until the date of their expiration when properly stored at 15-30°C.

Working reagent is stable for 30 days when properly stored at 15-30°C. Do not use Working reagent if turbid.

Materials Required But Not Provided

Spectrophotometer capable of absorbance readings at 510 nm,
Constant temperature block or bath (37°C)

Temperature controlled cuvette well (37°C)

Interval timer

Accurate pipetting devices

Test Tubes

Vortex mixer

Specimen Collection and Preparation

Serum: Remove specimen from clot promptly to prevent hemolysis. Urine: Dilute a portion of well mixed and measured 24-hour urine collection 1:20 (1+19) with distilled water. Mix well.

Sample Stability: Creatinine values have a reported stability of one day at 2-8°C, and several months when frozen (-20°C) and protected from evaporation and contamination. Urine specimens must be preserved with 15 grams of boric acid. Urine is stable for 4 to 7 days at room temperature (15-25°C).

Interfering Substances: A number of substances affect the accuracy of creatinine determination. See Young, et al⁷ for a comprehensive list.

Automated Analyzers

Parameters:

Wavelength	510 nm
Reaction Type	Kinetic
Reaction Direction	Increasing
Reaction Temperature	37°C
Sample/Reagent Ratio	1:20
Lag Time	20 Seconds
Read Time	60 Seconds
Blank Absorbance Limit	<0.200
High Absorbance Change/Min	0.625ΔA/Min.
Standard Value	5 mg/dL
Low Normal	0.7 mg/dL
High Normal	1.5 mg/dL
Linearity	20 mg/dL

Above parameters should be employed in programming automated analyzers for Creatinine. Specific programming applications for most automated analyzers are available from Stanbio Customer Service Department.

Manual Procedure

1. Set spectrophotometer cuvette temperature to 37°C.
2. Zero spectrophotometer with D.I. water at 510 nm.
3. Pipet 1.0 mL of working reagent into test tubes and prewarm at 37°C for 3 minutes.
4. Transfer 0.050 mL (50 μL) of standard to test tube, mix and immediately place in cuvette well.
5. After exactly twenty (20) seconds read and record absorbance (A₁).
6. At exactly sixty (60) seconds after reading (A₁), read and record absorbance (A₂).
7. Calculate change in absorbance (ΔA) by subtracting (A₂-A₁).
8. Run patients and controls by following steps 4 through 7.

Quality Control: Two (2) levels of control material with known Creatinine levels determined by this method, should be analyzed each day of testing.

Results

Values are derived by comparing the absorbance change (ΔA) of the unknown (u) with that of a standard (s) identically treated.

$$\text{Serum Creatinine (mg/dL)} = \frac{\Delta A_u}{\Delta A_s} \times 5$$

Where ΔA_u and ΔA_s are the absorbance changes (increase) of unknown and standard, respectively, and 5 the concentration of standard (mg/dL).

Example: ΔA_u = 0.01, ΔA_s = 0.05

$$\text{Serum Creatinine (mg/dL)} = \frac{0.01}{0.05} \times 5 = 1.0$$

$$\text{Urine Creatinine (mg/dL)} = \frac{\Delta A_u}{\Delta A_s} \times 5 \times 20 \text{ (Dilution factor)}$$

$$\text{Urine Creatinine (mg/L)} = \text{Urine Creatinine (mg/dL)} \times 10$$

$$\text{Urine Creatinine (mg/L/24hrs.)} = \text{Urine Creatinine (mg/L)} \times \frac{24 \text{ hrs. (mL)}}{1000}$$

Expected Values⁸

Normal Range: Male (serum): 0.9 - 1.5 mg/dL
 Male (urine): 1000 - 2000 mg/24hrs.
 Female (serum): 0.7 - 1.4 mg/dL
 Female (urine): 600 - 1500 mg/24hrs.

This range should serve only as a guideline. It is recommended that each laboratory establish its own range of expected values, since differences exist between instruments, laboratories and local populations.

Performance Characteristics⁹

Correlation: Serum and control samples (n = 38) having creatinine values between 0.6 – 25 mg/dL were assayed by this method and by a similar commercially available kinetic procedure. Statistical analysis revealed a correlation coefficient (r) of 0.998, with a regression equation of y = 0.96x + 0.046.

Precision:	Mean (mg/dL)	SD	CV%
	Within Run		
	0.9	0.08	4.0
	8.6	0.09	2.1
	Between Run		
	1.1	0.08	4.8
	8.4	0.16	2.6

Sensitivity: Based on an instrument resolution of A = 0.001, the method presented shows a sensitivity of 0.16 mg/dL.

Linearity: Linear to 20 mg/dL. Samples exceeding this value should be diluted 2-fold (1+1) with deionized water, the assay repeated and results multiplied by 2.

References

1. Jaffe M. *Physiol Chem* 10:391, 1886
 2. DiGiorgio J. In *Clin. Chem. - Principles and Technics*, RJ Henry et al, Eds, Harper & Row, Hagerstown, MD, 1974, pp549 - 550.
 3. Cook JGH. *Ann Clin Biochem* 12:219, 1975
 4. Tausky HH. In *Standard Methods of Clinical Chemistry*, Vol 3, D Seligson, Ed. Academic Press, New York, 1966, p99
 5. Heinegard D, Tiderstrom G. *Clin Chim Acta* 43:305, 1973
 6. Fabinay DL, Eringshausen G. *Clin Chim* 17:696, 1971
 7. Young DS et al. *Clin Chem* 21:286 D, 1975 (Special Issue)
 8. Larsen K. *Clin Chim Acta* 41:209, 1972
 9. Stanbio Laboratory Data
- STANBIO LABORATORY, LP DISCLAIMS ALL EXPRESS AND IMPLIED WARRANTIES OF THE MERCHANTABILITY AND FITNESS PERTAINING TO THIS PRODUCT WHICH ARE NOT EXPRESSLY DETAILED IN THIS PACKAGING INFORMATION OR A WRITTEN AGREEMENT BETWEEN THE BUYER AND SELLER OF THIS PRODUCT.
- STANBIO LABORATORY, LP MAINTAINS THAT THIS PRODUCT CONFORMS TO THE INFORMATION CONTAINED IN THIS INSERT. PURCHASER MUST DETERMINE THE SUITABILITY OF THE PRODUCT FOR ITS PARTICULAR USE. USE ONLY IN ACCORDANCE WITH LABELING INSTRUCTIONS.

For Technical Service call: 800-531-5535 • (830) 249-0772

Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com

http://www.stanbio.com

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006

DN: RBR.0420.CE.EN.00-M • Last Revision: 09/05 • Procedure No. 0420



Stanbio LiquiColor® Creatinina Proced. No. 0420

Para la determinación cinética cuanti-tativa de Creatinina en suero u orina.

Resumen y Principio

En 1986 Jaffe¹ describió un método para la determinación de creatinina, haciendo reaccionar un filtrado libre de proteínas con ácido pírco en una solución alcalina. Aunque desde entonces se han descrito muchos métodos, la reacción clásica de Jaffe es la más usada. Esta reacción está sujeta a interferencias a causa de varias sustancias como proteínas y glucosa^{2,3,4}. Para combatir ésta desventaja, se han desarrollado algunas modificaciones⁵. Los métodos, cinéticos son los más usados por ser rápidos, sencillos y sin interferencias. El presente método se basa en una modificación de la velocidad de reacción de Fabinay y Eringshausen.⁶

Creatinina + ácido pírco complejo
creatinina-picrato
(amarillo-naranja)

La creatinina reacciona con el ácido pírco en medio alcalino para formar un complejo de color el cual absorbe a 510 nm. La velocidad de formación de color es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

Reactivos

Creatinina Acida, Cat. No. 0421

Solución acuosa de ácido pírco, 3.6 mmol/L.

Creatinina Base, Cat. No. 0422

Hidróxido de sodio en agua 240 mmol/L.

Estandar de Creatinina (5.0 mg/dL), Cat. No. 0423

Solución acuosa de creatinina cloruro de cinc, 5.0 mg/dL.

Precauciones: *Para uso de diagnóstico in vitro.*

El hidróxido de sodio debe manejarse con cuidado por ser cáustico. El ácido pírco es un agente oxidante fuerte. Evite el contacto con la piel. Limpie cualquier salpicadura, ya que el ácido pírco seco es explosivo.

Preparación del Reactivo: Mezcle un volumen de ácido pírco con un volumen de hidróxido de sodio.

Estabilidad y Almacenamiento del Reactivo: Los reactivos ya mezclados son estables por 30 días a 15-30°C. El estandar es estable hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta, cuando se conserva a 2-8°C. No utilice los reactivos si estos están turbios.

Materiales Requeridos Pero No Incluidos

Espectrofotómetro para leer absorbancias a 510 nm.
Pipetas exactas para medir volúmenes de 0.05 mL y 1.0 mL.
Vasos de precipitado para mezclar reactivos (vidrio o plástico).
Tubos de ensayo y/o celdillas para espectrofotómetro
Cronómetro

Recolección y Preparación de la Muestra

Suero: Separa rápidamente el suero del coágulo para prevenir la hemólisis.

Orina: Colecte la orina de 24 horas, mezcle bien y diluya 1:20 (1x19) con agua destilada. Mezcle bien.

Estabilidad de Muestra: La creatinina sérica es estable por 24 horas a 2-8°C y por varios meses a -20°C en recipientes bien cerrados que eviten la evaporación y la contaminación. La muestra de orina de 24 horas debe conservarse añadiendo 15 g. de ácido bórico. La orina es estable 4-7 días a temperatura ambiente.

Substancias Interferentes: Varias sustancias afectan la exactitud en la determinación de la creatinina. Ver lista completa en Young, et al⁷.

Analizador Automatizado

Parámetros:

Longitud de onda	510 nm
Tipo de reacción	Cinética
Dirección de la reacción	Incremento
Temperatura de reacción	37°C
Relación muestra/reactivo	1:20
Tiempo de equilibrio	20 seg.
Tiempo de lectura	60 seg.
Límite de absorbancia blanco	<0.200
Cambio de absorbancia alta/min	0.150 Δ A/Min.
Valor Estandar	5 mg/dL
Valor normal bajo	0.7 mg/dL
Valor normal alto	1.5 mg/dL
Linealidad	20 mg/dL
Paso de luz de la celda	1 cm

Los parámetros antes mencionados deben usarse para programar los analizadores automatizados de Creatinina. Consulte su manual del instrumento para instrucciones de programación.

Procedimiento Manual

1. Coloque las celdillas del espectrofotómetro a 37°C.
2. Lleve a 0 el espectrofotómetro con agua a 510 nm.
3. Pipete 1.0 mL del reactivo en uso en los tubos de ensayo y incube a 37°C por 3 minutos.
4. Transfiera 0.05 mL (50 µL) del estandar en un tubo de ensayo, mezcle e inmediatamente y pase a una celdilla.
5. Transcurridos exactamente 20 seg. lea y registre la absorbancia (A₁).
6. Exactamente 60 segundos después de la lectura (A₁), lea y registre la absorbancia (A₂).
7. Calcule el cambio de absorbancias (ΔA) restando (A₁-A₂).
8. Corra las muestras de pacientes y los controles siguiendo los pasos del 4 al 7.

Control de Calidad: Incluya en cada corrida de muestras un suero control y/o orina conocidos por este método.

Resultados

Los valores resultan de comparar el cambio de absorbancia (ΔA) de la muestra problema (u) con el de un estandar (s) tratado en forma idéntica.

$$\text{Creatinina Sérica (mg/dL)} = \frac{\Delta Au}{\Delta As} \times 5$$

donde ΔAu y ΔAs son los cambios de absorbancia, (incrementos) de la muestra problema y del estandar respectivamente, y 5 es la concentración del estandar (mg/dL).

Ejemplo: ΔAu = 0.01 ΔAs = 0.05

$$\text{Creatinina Sérica (mg/dL)} = \frac{0.01}{0.05} \times 5 = 1.0$$

$$\text{Creatinina en orina (mg/dL)} = \frac{\Delta Au}{\Delta As} \times 5 \times 20 \text{ (factor de dilución)}$$

$$\text{Creatinina en orina (mg/L)} = \text{Creatinina en orina (mg/dL} \times 10)$$

$$\text{Creatinina en orina (mg/L/24 hrs.)} = \text{Creatinina en orina (mg/L)} \times 24 \text{ hrs. (mL)} / 1000$$

Valores Esperados⁸

Hombres (Suero) 0.9 - 1.5 mg/dL (orina) 1000-2000 mg/24 hrs.
Mujeres (Suero) 0.7 - 1.4 mg/dL (orina) 600-1500 mg/24 hrs.

Características

Linealidad: Hasta 20 mg/dL.

Correlación: Muestras de suero y control (n = 38) con valores de creatinina entre 0.6-25 mg/dL fueron analizadas por el método aquí descrito y por un procedimiento cinético similar. El análisis estadístico reveló un coeficiente de correlación (r) de 0.988, con una ecuación de regresión y = 0.96 x + 0.046.

Precisión: Media (mg/dL)	Intraensayo		CV%
	SD		
0.9	0.08		4.0
8.6	0.09		2.1
	Interensayo		
1.1	0.08		4.8
8.4	0.16		2.6

Referencias

1. Jaffe M. Z Physiol Chem 10:391, 1886
2. DiGiorgio J. in Clinical Chemistry – Principles and Technis, RJ Henry et al, Eds, Harper & Row, Hagerstown, MD, 1974, pp. 549-550
3. Cook JGH, Ann Clin BioChemn 12:219, 1975
4. Tausky HH, in Standard Methods of Clinical Chemistry Vol 3, D Seligson, Ed. Academic Press, New York, 1966, p99.
5. Heinegard D, Tiderstrom G. Clin Chem Acta 43:305, 1973.
6. Fabinay DL, Ertinghausen G. Clin Chem 17:696, 1971.
7. Young DS et al. Clin Chem 21:286 D, 1975 (Special Issue).
8. Larsen K. Clin Chem Acta 41:209, 1972.

STANBIO LABORATORY, LP DECLINA TODAS LAS GARANTIAS EXPRESADAS E INVOLUCRADAS EN LA NEGOCIABILIDAD Y PROPIEDAD CONCERNIENTE A ESTE PRODUCTO, QUE NO ESTEN EXPRESAMENTE DETALLADAS EN LA INFORMACION CONTENIDA EN EL EMPAQUE O SI NO HAY UN ACUERDO ESCRITO ENTRE EL COMPRADOR Y EL VENDEDOR DE ESTE PRODUCTO.

STANBIO LABORATORY, LP SOSTIENE QUE ESTE PRODUCTO CUMPLE CON LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTE INSERTO. EL COMPRADOR DEBE DETERMINAR LA CONFORMIDAD DEL PRODUCTO PARA SU USO PARTICULAR. USELO SOLO DE ACUERDO A LAS INSTRUCCIONES DE LA ETIQUETA.

Para asistencia técnica llame: 800-531-5535 • (830) 249-0772

Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com

http://www.stanbio.com

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006

DN: RBR.0420.CE.ES.00-P • Última Revisión: 09/05 • Proced No. 0420