

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Maia Calzia

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS ENZIMÁTICO E COLORIMÉTRICO DE
JAFÉ PARA DOSAGEM DE CREATININA E ESTIMATIVA DA TAXA DE
FILTRAÇÃO GLOMERULAR EM CRIANÇAS**

Porto Alegre

2018

Maia Calzia

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS ENZIMÁTICO E COLORIMÉTRICO DE
JAFÉ PARA DOSAGEM DE CREATININA E ESTIMATIVA DA TAXA DE
FILTRAÇÃO GLOMERULAR EM CRIANÇAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof. Dr. Joíza Lins Camargo
Coorientadora: MSc. Priscila Aparecida Correa Freitas

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Calzia, Maia

Comparação entre métodos enzimático e colorimétrico de Jaffe para dosagem de creatinina e estimativa da taxa de filtração glomerular em crianças. / Maia Calzia. -- 2018.

59 f.

Orientadora: Joíza Lins Camargo.

Coorientadora: Priscila Aparecida Correa Freitas.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Creatinina. 2. Método enzimático. 3. Jaffe. 4. Taxa de Filtração Glomerular. 5. Pediatria. I. Camargo, Joíza Lins, orient. II. Freitas, Priscila Aparecida Correa, coorient. III. Título.

Maia Calzia

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS ENZIMÁTICO E COLORIMÉTRICO DE
JAFÉ PARA DOSAGEM DE CREATININA E ESTIMATIVA DA TAXA DE
FILTRAÇÃO GLOMERULAR EM CRIANÇAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ana Laura Pimentel
Serviço de Diagnóstico Laboratorial – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Dr. Aline Beckenkamp
Laboratório de Análises Clínicas Carlos Franco Voegeli da ISCMPA.

Prof. Dr. Joíza Lins Camargo – Serviço de Endocrinologia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (orientadora)

RESUMO

Na clínica, a avaliação da função renal sustenta-se principalmente na análise da Taxa de Filtração Glomerular (TFG), estimada pelos níveis séricos de creatinina. Com base na literatura, sabe-se que o método colorimétrico de Jaffe, atualmente o mais utilizado para dosagem de creatinina, sofre interferências significativas quando aplicado em pacientes pediátricos, podendo fornecer uma visão equivocada do quadro clínico destes indivíduos. Enquanto isso, o método enzimático para dosagem de creatinina é citado como mais específico e menos suscetível a interferentes, além de ser a metodologia de referência na fórmula *Schwartz Bedside*, a equação mais recomendada para estimar a TFG em pacientes pediátricos. Frente a isso, este estudo tem como objetivo realizar a comparação entre os métodos enzimático e colorimétrico de Jaffe para dosagem de creatinina e estimativa da TFG em crianças e adolescentes. Para tanto, foi primeiramente realizada uma comparação entre os métodos em 40 amostras de soro de pacientes adultos, advindas do Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Para o objetivo principal, foram recrutados 132 pacientes pediátricos (0-18 anos) no ambulatório da Zona 14 do HCPA. Os pacientes foram categorizados por faixa etária, e a TFG estimada pela fórmula *Schwartz Bedside*. Os métodos de creatinina foram analisados quanto à correlação (teste de Pearson) e concordância (Bland-Altman ou coeficiente Kappa). Como resultado, foi encontrada uma excelente correlação e concordância entre os métodos nas amostras de indivíduos adultos. Em contraste, foi evidenciada correlação moderada entre os ensaios nas amostras de pacientes pediátricos, além de progressiva perda de associação e concordância com a diminuição da idade dos pacientes, sendo a faixa etária de 0 a 2 anos a mais afetada. De um modo geral, os níveis de creatinina enzimática foram maiores em comparação à colorimétrica. Além disso, foi observada uma baixa concordância nos resultados da TFG obtidos entre os métodos de creatinina em crianças e adolescentes, quando aplicado a fórmula de *Schwartz Bedside*. Com os dados deste estudo, concluímos que houve uma importante diferença entre a quantificação da creatinina pelos dois métodos estudados, o que impactaria na avaliação da função renal de pacientes pediátricos.

Palavras-chave: Creatinina. Método Enzimático. Jaffe. Taxa de Filtração Glomerular. Pediatria.

ABSTRACT

In clinical practice, the evaluation of renal function is mainly based on the analysis of Glomerular Filtration Rate (GFR), estimated by serum creatinine levels. It is known that Jaffe's colorimetric method, currently the most used for creatinine analysis, suffers significant interferences when applied in pediatric patients, and may provide a misleading of the clinical condition of these individuals. Meanwhile, the enzymatic method for creatinine analysis is quoted as being more specific and less susceptible to interfering, in addition to being the reference methodology in the *Schwartz Bedside* formula, the most recommended equation for estimating GFR in pediatric patients. Therefore, this study aims to compare Jaffe's colorimetric and enzymatic methods for creatinine analysis and estimation of GFR in children and adolescents. For this, a comparison was made between the methods in 40 serum samples from adult patients from the Laboratory Diagnostic Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). For the main objective, 132 pediatric patients (0-18 years old) were recruited at the HCPA Zone 14 ambulatory. Patients were categorized by age group, and GFR estimated by the *Schwartz Bedside* formula. The creatinine methods were analyzed for correlation (Pearson test) and concordance (Bland-Altman and Kappa coefficient). As a result, an excellent correlation and agreement was found between the methods in the samples from adult subjects. In contrast, a moderate correlation was found between the trials in the samples of pediatric patients, in addition to a progressive loss of association and agreement with the decrease in the patients' age, being the age group 0 to 2 years the most affected. In general, enzymatic creatinine levels were higher in comparison to colorimetric. In addition, a low agreement was observed in the results of the GFR obtained between the creatinine methods in children and adolescents, when applied to the formula of *Schwartz Bedside*. With this study we conclude that there seems to be an important difference between the quantification of creatinine by the two methods studied, which would impact on the evaluation of the renal function of pediatric patients.

Keywords: Creatinine. Enzymatic Assay. Jaffe. Glomerular Filtration Rate. Pediatrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Correlação entre métodos de creatinina enzimático e Jaffe em adultos.....	23
Figura 2 – Concordância de Bland-Altman em adultos.....	24
Figura 3 – Correlação entre métodos de creatinina enzimático e Jaffe em crianças.....	25
Figura 4 – Níveis de creatinina pelos métodos de Jaffe e enzimático de acordo com a faixa etária.....	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	7
1.1	DRC E AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL.....	7
1.2	TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR.....	9
1.3	CREATININA.....	11
1.4	MÉTODOS DE DOSAGEM.....	12
1.5	JUSTIFICATIVA.....	15
1.6	OBJETIVOS	16
1.6.1	Objetivo geral.....	16
1.6.2	Objetivos específicos.....	16
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	17
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	36
	REFERÊNCIAS	37
	APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	41
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CLINICAL	
	BIOCHEMISTRY	42

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 DRC E AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

A Doença Renal Crônica (DRC) corresponde a um importante problema de saúde pública atualmente. No Brasil e no mundo, tem-se observado um progressivo aumento no número de indivíduos com distúrbios renais em seus estágios mais avançados, o que preocupa as organizações de saúde considerando que o prognóstico, na maioria dos casos, não é favorável e os custos do tratamento são elevados (PORTO et al., 2017; SESSO et al., 2014; CAMARGO et al., 2018). Dados recentes de estudos epidemiológicos apontaram um aumento médio anual de 4,6% no número de pacientes com Doença Renal Terminal (DRT) sob tratamento dialítico no Brasil (SANTOS JÚNIOR et al., 2016). Compilando informações do período de 2008 a 2013, foi possível visualizar a diferença da prevalência da doença nas regiões brasileiras, estando a região sul na terceira posição com uma prevalência de pacientes com DRT de 14%, ficando atrás das regiões Sudeste (49%) e Nordeste (25%) (SANTOS JÚNIOR et al., 2016). A maioria dos estudos epidemiológicos nesta área se concentram em dados da população em geral ou adultos, sendo raros os trabalhos que relatam as proporções da doença em adolescentes e crianças. Estimativas obtidas em uma pesquisa relativa ao ano de 2012 apontaram um total de 1.283 pacientes pediátricos sob tratamento de diálise crônica no Brasil, resultando em uma proporção de 20 casos por milhão relativo ao grupo em estudo (KONSTANTYNER et al., 2015).

A DRC é caracterizada pelo progressivo declínio da função renal, estando em muitos casos associada a patologias sistêmicas subjacentes como hipertensão arterial, diabetes mellitus e doenças autoimunes (CHEUICHE et al., 2013; ROMÃO JÚNIOR, J.E., 2004). Segundo o *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) da *National Kidney Foundation* (NKF), em seu guia *Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease* publicado em 2012, a DRC é definida como “anormalidades da estrutura ou função renal, presentes por mais de 3 meses, com implicações para saúde” (KDIGO, 2012, p.5). Atualmente, para a classificação ou estadiamento da doença em crianças a partir de 2 anos e adultos, recomenda-se considerar a Taxa de Filtração Glomerular (TFG) e o nível de albuminúria, ambos associados à causa do distúrbio renal (KDIGO, 2012).

De acordo com a TFG (expressa em ml/min/1,73m²), a DRC pode ser classificada em seis estágios conforme o grau de comprometimento renal, sendo estes: (G1) TFG ≥ 90 (normal ou aumentada); (G2) TFG 60 - 89 (levemente diminuída); (G3A) TFG 45 - 59 (levemente à moderadamente diminuída); (G3B) TFG: 30 - 44 (moderadamente à severamente diminuída); (G4) TFG 15 - 29 (severamente diminuída) e (G5) TFG < 15 (falência renal) (KDIGO, 2012). Não existe um consenso acerca dos valores ou categorias de TFG em crianças com idade inferior a 2 anos. No período dos 12 aos 18 meses de idade, normalmente são encontrados valores de TFG reduzidos em função do processo de maturação renal, o que dificulta a avaliação clínica nessa faixa etária por meio deste parâmetro. Para estes pacientes, a depuração da inulina ainda é o método mais recomendado (DEN BAKKER, E.; GEMKE, R.J.B.J.; BÖKENKAMP, A., 2018; KDIGO, 2002; OTUKESH et al., 2012). Baseando-se em estudos prévios, a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica sugere os valores de referência descritos na Tabela 1 (SBPC/ML, 2015). Quanto aos níveis de albuminúria (expressa em mg por g de creatinina), pode-se categorizar em três grupos: (A1) albuminúria < 30 mg/g (normal à levemente aumentada); (A2) albuminúria 30 – 300mg/g (moderadamente aumentada); (A3) albuminúria > 300 mg/g (severamente aumentada) (KDIGO, 2012).

Tabela 1 – Valores de referência para TFG em crianças menores de 2 anos, conforme NKF-K/DOQI

IDADE	TFG +/- DP (mL/min/1,73m²)
1 semana	41 +/- 15
2 - 8 semanas	66 +/-25
8 semanas - 2 anos	96 +/- 22

TFG: taxa de filtração glomerular; DP: desvio padrão.

Fonte: Adaptado de SBPC/ML, 2015, p.8.

Para auxiliar na identificação do desfecho e na tomada de decisão médica, indica-se também a avaliação da causa da doença por meio da investigação do contexto clínico do paciente, histórico familiar, presença de outras doenças subjacentes como diabetes mellitus ou distúrbios cardiovasculares, e também presença de anormalidades renais anatomopatológicas (PORTO et al., 2017). Além disso, para estabelecer o diagnóstico de DRC são considerados alguns critérios clínico-analíticos que sumariamente consistem na presença de lesão do parênquima renal por mais de 3 meses evidenciada por marcadores renais ou exames de

imagem, e/ou um valor de TFG inferior a 60mL/min/1,73m² (AMB/CFM, 2011). No Quadro 1 abaixo estão descritos os critérios de avaliação propostos pela KDIGO.

Quadro 1 – Critérios para diagnóstico de DRC

Critérios para DRC (qualquer um dos itens abaixo presentes por > 3 meses)	
Marcadores de Dano Renal	Albuminúria (> 30 mg/24h; relação albumina/creatinina expresso por mg/g) Anormalidades no sedimento urinário Distúrbios eletrolíticos devido a lesões tubulares Anormalidades detectadas por exame histológico Anormalidades estruturais detectadas por exame de imagem Histórico de transplante renal
TFG diminuída	< 60mL/min/1,73m ² (categorias de TFG G3a-G5)

Fonte: Adaptado de Kirsztajn et al. (2014).

A avaliação da função renal, portanto, é fundamental na prática clínica para a detecção destes distúrbios renais, sustentando-se principalmente na análise da TFG e em possíveis alterações nos níveis de alguns metabólitos séricos que apresentam excreção urinária (KIRSZTAJN, G.M, 2009). Essa análise permite que, além do monitoramento da progressão e estadiamento da doença, sejam realizados o controle e adequação da resposta terapêutica e determinação de um prognóstico seguro. Dado o caráter progressivo, silencioso e assintomático das disfunções renais, o estabelecimento de um diagnóstico precoce e acompanhamento dos pacientes são cruciais para evitar desfechos indesejáveis e complicações tais como acidose metabólica, anemia, alterações do metabolismo de cálcio e fósforo, dano cardiovascular, necessidade de terapia renal substitutiva (TRS) ou até mesmo óbito (PORTO et al., 2017; AMB/CFM, 2011; ABENSUR, H. 2011).

1.2 TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR

A taxa de filtração glomerular representa a principal forma de avaliação da função renal e corresponde ao volume plasmático filtrado pelos rins por unidade de tempo, podendo ser medida de diferentes formas (KIRSZTAJN, G.M, 2009). O método referência para mensuração da TFG baseia-se na depuração de substâncias exógenas consideradas marcadores de filtração, o quais devem se enquadrar nos seguintes critérios: (1) ser filtrada livremente pelos rins; (2) não sofrer reabsorção ou secreção tubular; (3) não se ligar a proteínas séricas; (4) apresentar taxa de produção constante e; (5) poder ser quantificada de forma acurada (DEN BAKKER, E.; GEMKE, R.J.B.J.; BÖKENKAMP, A., 2018). São exemplos desses marcadores a inulina, iotalamato- I^{125} (radioisótopo), iohexol, ácido-etilenodiaminotetra-acético- Cr^{51} (EDTA- Cr^{51}) e ácido dietilenotriaminopenta-acético- Tc^{99m} (DTPA- Tc^{99m}) (BRITO, T.N.Z; OLIVEIRA, A.R.A; SILVA, A.K.C, 2016; KOOMAN, J.P, 2009; SCHWARTZ, G.J.; WORK, D.F, 2009). Dentre estes, a inulina é a mais recomendada, entretanto, esta metodologia vem deixando de ser realizada em virtude da dificuldade de aplicação na clínica por ser uma técnica demorada, cara, que exige várias infusões, além de apresentar erros pela incompreensão por parte dos pacientes, da forma adequada de proceder a coleta das amostras (KIRSZTAJN, G.M, 2009; ABENSUR, H., 2011).

As técnicas alternativas fundamentam-se na detecção dos níveis séricos e urinários de compostos endógenos, que se enquadrem nos critérios de marcadores de filtração, como a creatinina, cistatina C e ureia. Atualmente, a dosagem da creatinina é a mais recomendada para determinação de TFG (KDIGO, 2012) pois apesar de uma pequena fração ser secretada pelos túbulos renais, possui produção constante sendo filtrada livremente pelos rins. (KDIGO,2012).

O uso da creatinina para estimar a TFG iniciou-se com a determinação do *clearance* renal por dosagem em urina de 24h. Este método é utilizado ainda hoje, contudo, apresenta um número de erros considerável, devido a erros na coleta da amostra, aumento da ingesta hídrica e influência de alguns medicamentos sobre a depuração da creatinina. (BERG et al., 1989; LEVEY et al., 1999; ABENSUR, H., 2011). Frente a isso, a técnica mais utilizada e recomenda atualmente para obtenção da TFG é através da sua estimação por meio de fórmulas que fazem uso da creatina sérica e levam em consideração aspectos individuais como idade, sexo, etnia e massa corpórea (BRITO, T.N.Z; OLIVEIRA, A.R.A; SILVA, A.K.C, 2016). As mais conhecidas são as equações de Cockcroft-Gault (CG) (COCKCROFT, D.W.; GAULT, M.H, 1976), MDRD (desenvolvida em pacientes com DRC)

(LEVEY et al., 1999) e a CKD-EPI (desenvolvida em pacientes sem doença renal) (LEVEY et al., 2009), sendo as duas últimas as mais recomendadas pela *National Kidney Foundation* (NKF), devido à alta acurácia e precisão para estimar a TFG em adultos (maiores de 18 anos) (BRITO, T.N.Z; OLIVEIRA, A.R.A; SILVA, A.K.C, 2016).

Para estimação da TFG em adolescentes, crianças e neonatos, preconiza-se o uso da fórmula de *Schwartz* (SCHWARTZ et al., 1976; SCHWARTZ, G.J., BRION, L.P; ADRIAN, S., 1987). Sua versão original foi criada em meados da década de 70, integrando as características de altura, uma constante “k” relativa a idade e os valores de creatinina sérica dosados principalmente pelo método de Jaffe sem calibração padronizada. Posteriormente, foram realizados trabalhos que propuseram modificações na fórmula de *Schwartz* baseado em um método enzimático rastreável para Espectrometria de Massa com Diluição Isotópica (no inglês, IDMS). Esta equação modificada foi chamada “*Bedside*” *Schwartz* e atualmente é a mais recomendada para estimar a TFG em crianças e adolescentes, considerando informações como altura, creatinina sérica e uma constante “k” fixa: $TFG \text{ (mL/min/1,73m}^2\text{)} = 0,41 \times \text{altura (em cm)} / \text{creatinina (em mg/dL)}$ (SCHWARTZ et al., 2009).

1.3 CREATININA

A creatinina é um dos principais biomarcadores endógenos utilizados na clínica para avaliação da função renal. Sua molécula precursora, a creatina (Cr), é sintetizada nos rins e no fígado, sendo posteriormente armazenada no tecido muscular esquelético (cerca de 95%) e, ainda, em menores quantidades no coração, espermatozoides e células da retina (COSTALLAT et al., 2007). A enzima creatina quinase (CK) presente nesses tecidos é a responsável por catalisar a conversão reversível de creatina em fosfocreatina (Pcr), a qual funciona como reservatório energético fornecendo assim um aporte rápido de ATP (adenosina trifosfato) para as células, quando em situações de demanda energética (FERREIRA, L.G., 2014). A conversão de Pcr e Cr livre em creatinina ocorre de forma espontânea, dependente de pH e temperatura, sendo favorecida em temperaturas mais elevadas e pH ácido (WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R., 2000).

Apesar de uma pequena fração da concentração urinária de creatinina, a qual pode variar de 7% a 20%, corresponder àquela secretada ativamente pelos túbulos renais (SODRÉ, F., 2007), essa molécula ainda se enquadra nos critérios para ser usada como biomarcador

endógeno, uma vez que é produzida de forma constante e filtrada livremente pelos rins (DEN BAKKER, E.; GEMKE, R.J.B.J.; BÖKENKAMP, A., 2018). Além disso, sua forte correlação com o método referência para determinação da TFG (a depuração da inulina), e o caráter simples e reprodutível da técnica de dosagem são fatores que sustentam o uso desse marcador de filtração glomerular (ABENSUR, H., 2011; BASTOS M.G.; BASTOS R.M.R.; PAULA R.B., 2007).

Entretanto, a avaliação isolada da creatinina não é suficiente para prever o estado renal, fazendo-se necessário uma análise em conjunto da TFG. Isto se deve a importantes interferentes fisiológicos inerentes da creatinina (KDIGO, 2012). Um destes é a relação direta entre volume de massa muscular e produção de creatinina, onde quanto maior a massa corpórea do indivíduo, maiores serão os níveis basais do biomarcador. Espera-se, portanto, que homens geralmente apresentem valores de creatinina mais elevados em relação às mulheres, sendo o mesmo válido para adultos em relação às crianças (KIMMEL, P.L.; LEW S.Q.; BOSCH P., 1996). Além do gênero e idade, a etnia também deve ser considerada, uma vez que alguns grupos étnicos apresentam diferenças nos níveis de creatinina, devido a uma maior massa muscular, como é o caso do negro americano se comparado ao branco (BASTOS M.G.; BASTOS R.M.R.; PAULA R.B., 2007).

Em adição, fatores como o tipo de dieta e intensidade de exercícios físicos também podem causar alterações nos níveis séricos e urinários de creatinina. Sabe-se que a ingestão de alimentos ricos em proteínas conduz a um aumento da creatinina e, portanto, em dietas hipoproteicas ou vegetarianas, ou em quadros de desnutrição, os níveis de creatinina serão distintos. Também as atividades físicas intensas tendem a aumentar os níveis deste biomarcador, devido a um esforço muscular exacerbado e aumento da demanda energética. (ARAÚJO, E.R; RIBEIRO, P.S.; CARVALHO, S.F.D., 2009; SAMRA, M.; ABCAR, A., 2012).

1.4 MÉTODOS DE DOSAGEM

Os principais métodos utilizados para mensurar creatinina baseiam-se na metodologia colorimétrica de Jaffe ou na enzimática. O método de Jaffe, descrito em 1886, consiste na formação de complexos corados (vermelho alaranjado) resultantes da reação entre creatinina e

ácido pícrico em meio alcalino que podem ser lidos fotometricamente em 510nm (SODRÉ, F., 2007). Por ser um teste rápido e de baixo custo, ainda é o mais utilizados nos laboratórios, entretanto apresenta importantes interferentes descritos na literatura (CHEUICHE et al,2013; SAMRA, M.; ABCAR, A., 2012).

Sabe-se que outros compostos endógenos reagem com o picrato da mesma forma que a creatinina, superestimando a dosagem da mesma pelo aumento de ligações inespecíficas. São os chamados interferentes positivos, ou compostos não creatínicos, e incluem a glicose, proteínas plasmáticas, ácido ascórbico, corpos cetônicos, piruvato, etc. (PERAZZI, B.; ANGEROSA, M., 2011; CHEUICHE et al., 2013). Os interferentes negativos, representados principalmente pela bilirrubina e hemoglobina fetal, ao interagirem com o reagente da reação, acabam por diminuir a intensidade da coloração da creatinina levando à subestimação dos valores da mesma (PERAZZI, B.; ANGEROSA, M., 2011).

Para minimizar os efeitos desses interferentes, os laboratórios passaram a aderir à metodologias com calibrações que empregam um fator de compensação negativo nos resultados de creatinina, subtraindo da quantificação total do biomarcador a fração correspondente às ligações inespecíficas. Essas modificações levaram a uma variabilidade nos resultados e valores de referência de creatinina, dificultando, dessa forma, comparações de parâmetros de um mesmo paciente (SCHWARTZ et al.,2009; PIERONI et al., 2017; PERAZZI, B.; ANGEROSA, M., 2011). No intuito de promover uma harmonização dos resultados, em 2006 foram desenvolvidos padrões de calibração quantificados por um método de referência, a Espectrometria de Massa com Diluição Isotópica (no inglês, IDMS) (DODDER et al., 2007).

Essas correções podem favorecer a estimativa da TFG em adultos quando estes apresentam níveis de proteínas séricas normais. Entretanto, para neonatos e crianças, a compensação negativa interfere de forma significativa na estimativa da TFG, uma vez que esses pacientes possuem níveis de creatinina e proteína sérica naturalmente mais baixos, devido a uma menor massa muscular (SCHWARTZ et al.,2009; SCHWARTZ, G.J.; WORK, D.F, 2009). Outro fator importante em crianças é que, em neonatos, os níveis de bilirrubina geralmente estão aumentados em função da hemólise de eritrócitos fetais nos primeiros dias de vida (DEN BAKKER, E.; GEMKE, R.J.B.J.; BÖKENKAMP, A., 2018). No meio alcalino da reação, a bilirrubina é oxidada a biliverdina, diminuindo a absorvância no comprimento de onda usado na avaliação da creatinina e, por consequência, provoca a subestimação da

mesma. Sendo assim, a literatura descreve que a detecção do dano renal em crianças, especialmente em pacientes na faixa etária inferior a 2 anos, é prejudicada quando se faz uso do método colorimétrico de Jaffe (DEN BAKKER, E.; GEMKE, R.J.B.J.; BÖKENKAMP, A., 2018).

Com o uso do método enzimático, contudo, esses efeitos são superados uma vez que este ensaio não sofre influência de proteínas séricas e se mostra menos suscetível a outros interferentes (MOSS et al., 1975; NAH et al., 2016). Entretanto, é descrito que algumas substâncias como dopamina e dobesilato de cálcio podem interferir negativamente na reação (NIGAM, P.K; CHANDRA, A., 2017; PANTEGHINI, M., 2008). A metodologia enzimática baseia-se no uso de enzimas como creatinina amidohidrolase, creatina amidohidrolase e sarcosina oxidase associadas à reação de Tinder, resultando na formação de composto corado passível de ser quantificado fotometricamente (PERAZZI, B.; ANGEROSA, M., 2011). Além da sua maior especificidade, outro ponto favorável ao uso deste método, principalmente em crianças, corresponde ao fato de a fórmula *Schwartz Bedside* ter sido construída com base no método enzimático rastreável ao IDMS (SCHWARTZ et al., 2009; SCHWARTZ, G.J.; WORK, D.F, 2009).

1.5 JUSTIFICATIVA

O método de Jaffe, baseado na reação do picrato alcalino, foi desenvolvido para dosagem de creatinina há mais de um século, sendo ainda hoje a técnica majoritariamente utilizada nos laboratórios. Contudo, há algum tempo se conhece as limitações da técnica quanto aos seus interferentes analíticos. As correções para rastreabilidade e para reações inespecíficas na reação de Jaffe, somadas aos interferentes do próprio método, podem dificultar a veracidade dos resultados de creatinina em pacientes pediátricos, influenciando diretamente na estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG) nessa população. Como consequência, o diagnóstico e tratamento adequados dos distúrbios renais, principalmente em crianças e lactantes, podem ser prejudicados. Estudos prévios já demonstraram que o método enzimático apresenta maior especificidade e menor suscetibilidade a interferentes em comparação ao Jaffe, contudo, seu uso nos laboratórios ainda é limitado em função do maior custo. Além disso, em comparação ao volume de conteúdo científico disponível em adultos, são poucos os trabalhos que avaliam o impacto dessas interferências em pacientes pediátricos. A nova equação para estimar a TFG em crianças, *Schwartz Bedside*, possibilitou um impulso no uso do método enzimático na rotina assistencial, por ter utilizado um método enzimático rastreável ao IDMS como referência. Outra questão importante é que, embora essa e outras inúmeras fórmulas para estimar a TFG em crianças sejam propostas, a aplicação destas na população com idade inferior a 2 anos ainda é problemática.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

Comparar os métodos enzimático e colorimétrico de Jaffe para dosagem de creatinina e avaliar o impacto na estimativa da taxa de filtração glomerular em crianças e adolescentes.

1.6.2 Objetivos específicos

- (1) Realizar comparação entre os métodos colorimétrico de Jaffe e enzimático para dosagem de creatinina em amostra de soro de pacientes adultos e pediátricos;
- (2) Avaliar a concordância da estimativa da taxa de filtração glomerular (eTFG) pelo uso da fórmula *Schwartz Bedside* entre os métodos enzimático e colorimétrico de Jaffe em crianças e adolescentes.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Periódico: Clinical Biochemistry

Título: Comparação entre métodos enzimático e colorimétrico de Jaffe para dosagem de creatinina e estimativa de taxa de filtração glomerular em crianças.

Normas da Revista: disponível em: <https://www.elsevier.com/journals/clinical-biochemistry/0009-9120?generatepdf=true> e Anexo I.

COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS ENZIMÁTICO E COLORIMÉTRICO DE JAFFE PARA DOSAGEM DE CREATININA E ESTIMATIVA DA TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR EM CRIANÇAS

Maia Calzia^a; Priscila Aparecida Correa Freitas^a; Gabriel Giron Correa^a; Janaína Aparecida Risczik Arruda Correa^a; Joíza Lins Camargo^b;

^a: Unidade de Bioquímica do Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

^b: Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Serviço de Diagnóstico Laboratorial
Rua Ramiro Barcelos, 2350 - 2º andar – Largo Eduardo Zaccaro Faraco
CEP:90035-903 Porto Alegre, RS – Brasil
Fone: (55) 51-33598315/ FAX (55) 51-33598310
Caixa Postal: LSERVICOPATOLOGIACLINICA@hcpa.ufrg.br

Autor correspondente: Priscila Aparecida Correa Freitas
E-mail: pacfreitas@hcpa.edu.br

RESUMO

Na clínica, a avaliação da função renal sustenta-se principalmente na análise da Taxa de Filtração Glomerular (TFG), estimada pelos níveis séricos de creatinina. Com base na literatura, sabe-se que o método colorimétrico de Jaffe, atualmente o mais utilizado para dosagem de creatinina, sofre interferências significativas quando aplicado em pacientes pediátricos, podendo fornecer uma visão equivocada do quadro clínico desse grupo. Enquanto isso, o método enzimático para dosagem de creatinina é citado como mais específico e menos suscetível a interferências, além de ser a metodologia de referência na fórmula *Schwartz Bedside*, a equação mais recomendada para estimar a TFG em crianças. Frente a isso, este estudo tem como objetivo realizar a comparação entre os métodos enzimático e colorimétrico de Jaffe para dosagem de creatinina e estimativa da TFG em pacientes pediátricos. Para tanto, foi primeiramente realizada uma comparação entre os métodos em 40 amostras de soro de pacientes adultos, advindas do Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Para o objetivo principal, foram recrutados 132 pacientes pediátricos (0-18 anos) no ambulatório da Zona 14 do HCPA. Os pacientes foram categorizados por faixa etária, e a TFG estimada pela fórmula *Schwartz Bedside*. Os métodos de creatinina foram analisados quanto à correlação (teste de Pearson) e concordância (Bland-Altman ou coeficiente Kappa). Como resultado, foi encontrada uma excelente correlação e concordância entre os métodos nas amostras de indivíduos adultos. Em contraste, foi evidenciada correlação moderada entre os ensaios nas amostras de pacientes pediátricos, além de progressiva perda de associação e concordância com a diminuição da idade dos pacientes, sendo a faixa etária de 0 a 2 anos a mais afetada. De um modo geral, os níveis de creatinina enzimática foram maiores em comparação à colorimétrica. Além disso, foi observada uma baixa concordância na classificação da função renal pela TFG entre os métodos, quando aplicado a fórmula de *Schwartz Bedside*. Este estudo mostrou que há uma importante diferença na quantificação da creatinina entre os métodos estudados, o que impactaria na avaliação da função renal de crianças e adolescentes (<18 anos) em todas as faixas etárias.

Palavras-chave: Creatinina. Método enzimático. Jaffe. Taxa de Filtração Glomerular. Pediatria.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, tem-se observado o progressivo aumento do número de indivíduos com distúrbios renais em estágios avançados [1]. Dados recentes de estudos epidemiológicos, apontaram um aumento médio anual de 4,6% no número de pacientes com Doença Renal Terminal (DRT) sob tratamento dialítico no Brasil [2], [3]. A Doença Renal Crônica (DRC) é caracterizada pela presença de anormalidades na estrutura e fisiologia renal presentes por mais de três meses com implicações para saúde, e corresponde a um importante problema de saúde pública, visto que o prognóstico, na maioria das vezes, não é favorável e os custos do tratamento são elevados [3], [4].

Na prática clínica, a taxa de filtração glomerular (TFG), definida como volume plasmático filtrado pelos rins por unidade de tempo, corresponde a principal ferramenta para avaliação da função renal [5], [6]. A TFG se baseia na detecção de níveis de marcadores de filtração, os quais variam de acordo com a atividade glomerular. O método referência utilizado para determinação da TFG é a depuração de inulina ou de outros compostos radiológicos e radioativos como iotalamato- I^{125} (radioisótopo), iohexol, ácido-etilenodiaminotetra-acético- Cr^{51} (EDTA- Cr^{51}) e ácido dietilenotriaminopenta-acético- Tc^{99m} (DTPA- Tc^{99m}) [5], [7]–[11]. Essas substâncias possuem apenas excreção renal, sendo filtradas livremente pelos rins, sem sofrerem reabsorção ou secreção tubular, o que as torna marcadores precisos. Todavia, possuem difícil aplicabilidade na prática clínica, sendo mais utilizadas em protocolos de pesquisa, por serem técnicas demoradas, caras, e exigirem várias infusões [5], [12]. O emprego de marcadores de filtração endógenos é fortemente recomendado para estimativa da TFG (eTFG) por equações específicas [13]–[16], devido à maior facilidade de análise, menor custo e maior agilidade na obtenção dos resultados. A eTFG pelos níveis séricos de creatinina é atualmente o método mais utilizado na prática clínica, e considera aspectos como idade, sexo, etnia e massa corpórea [17].

O método colorimétrico de Jaffe é ainda o ensaio mais empregado mundialmente para dosagem de creatinina, por apresentar baixo custo e fácil aplicabilidade. A reação se baseia na formação de complexos cromogênicos resultantes da interação entre o ácido pícrico e a creatinina da amostra em meio alcalino [6]. Devido à baixa especificidade analítica, existem inúmeros compostos que também interagem na reação, como a glicose, ácido úrico, proteínas séricas, etc. formando complexos corados que superestimam os resultados de creatinina [18]. Atualmente, muitos laboratórios empregam compensações negativas na calibração analítica do método para reduzir o efeito dessas ligações inespecíficas, tornando também o ensaio

rastreável ao método de referência de diluição isotópica por espectrometria de massa (IDMS) [19]–[21].

Na literatura é descrito o potencial impacto interferente da reação de Jaffe com calibração de referência ao IDMS em pacientes pediátricos, principalmente em crianças menores de 2 anos [15]. Isso porque crianças e adolescentes possuem menor massa muscular, o que naturalmente resulta em níveis de creatinina mais baixos. Em adição, os níveis de proteínas séricas em crianças também são fisiologicamente menores, o que implica em resultados falsamente diminuídos quando a dosagem é feita pela reação de Jaffe. Por consequência, a eTFG também é afetada por ser superestimada [13], [15]. Estudos demonstram que essa limitação metodológica poderia ser superada com o emprego de ensaios enzimáticos de creatinina, porém estes são relativamente mais caros e menos populares [22], [23].

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo comparar os valores séricos de creatinina obtidos a partir da dosagem pelos métodos colorimétrico de Jaffe e enzimático, e avaliar a concordância entre os ensaios na eTFG em crianças e adolescentes de um hospital universitário do sul do Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um estudo transversal e analítico experimental realizado no laboratório da Unidade de Bioquímica Clínica do Serviço de Diagnóstico Laboratorial (SDLab) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (GPPG 2018-0384). Primeiramente, foi realizada uma comparação entre os métodos colorimétrico de Jaffe e enzimático em amostras de soro (tubos sem aditivo Vacuette®, Greiner Bio One, Austria) de pacientes adultos (≥ 18 anos) de ambos os sexos, livres de hemólise, icterícia e lipemia, selecionadas da rotina do laboratório após realização dos exames assistenciais. As amostras foram selecionadas de acordo com os níveis séricos de creatinina dosados pelo método de Jaffe (método da rotina do SDLab), e distribuídas de maneira homogênea em diferentes faixas de concentração do analito (normal a muito elevado), com o propósito de cobrir todo o intervalo de análise do método. Para decidir essas faixas, foram utilizadas informações como intervalo de referência normal do teste (retirado da bula dos kits), e níveis de controle normal e alterado (encontrado nas bulas dos controles de qualidade interno), obtendo-se os seguintes grupos: (I) Níveis normais à levemente alterados: $< 2,0$

mg/dL (N= 15); (II) Níveis moderadamente alterados: 2,0 a 5,0 mg/dL (N= 15); (III) Níveis severamente alterados: > 5,0 mg/dL (N= 10). As amostras foram também dosadas pelo método enzimático, em 5 dias diferentes com 1 replicata (CLSI, 2005).

Para avaliar a concordância da estimativa da taxa de filtração glomerular (eTFG) entre os dois métodos em crianças e adolescentes, foram recrutados pacientes pediátricos com idades entre 0 e 18 anos, de ambos os sexos, no ambulatório de coleta do HCPA (ZONA 14). Para avaliação, foi preconizado distribuir os pacientes em faixas etárias com N mínimo de 20 participantes por grupo, seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial [24]. A definição da idade nesses grupos foi baseada em valores de referência previamente descritos [25], referenciando bebês (0 a 2 anos), crianças (3 a 12 anos) e pré-adolescentes ou adolescentes (13 a 18 anos).

Os pacientes foram pré-selecionados por apresentarem solicitação de dosagem de creatinina em soro, sendo então convidados a participar do estudo. Todos os participantes tiveram consentimento dos pais e/ou responsáveis, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Durante o recrutamento, foi aplicado um questionário aos responsáveis para obtenção de dados da criança como: data de nascimento, sexo, etnia, histórico de doenças e uso de medicações. Além disso, foram realizadas aferições antropométricas de peso e altura (fita métrica) dos participantes no mesmo dia da coleta da amostra de sangue. Foram excluídos da pesquisa pacientes com complicações severas (leucemia, falência renal, tumor maligno, etc.), diabetes, e aqueles com amostras de soro ictericas, lipêmicas, hemolisadas ou com volume insuficiente. As amostras, após liberação dos exames assistenciais (incluindo a creatinina por Jaffe), foram armazenadas e mantidas em freezer -80°C até o momento da dosagem pelo método enzimático.

A TFG nos pacientes pediátricos foi calculada utilizando a fórmula *Schwartz Bedside* (TFG expressa em mL/min/1,73m² = 0,41 x altura em cm/ Creatinina em mg/dL) [13] para os dois métodos, sendo a equação mais recomendada para crianças e adolescentes. Os resultados da TFG foram agrupados e comparados conforme a classificação dos estágios de doença renal crônica [4], com exceção das crianças com idade inferior a 2 anos, uma vez que essa categorização não é recomendada para este grupo.

Os métodos de creatinina analisados neste estudo são rastreáveis ao IDMS. A creatinina enzimática (Labtest, Brasil) foi realizada em automação bioquímica ARCHITECT ci4100 (Abbott, EUA), e a creatinina colorimétrica de Jaffe (Roche Diagnostics, Alemanha) no equipamento Cobas 8000 c702 (Roche Diagnostics, Alemanha). Para o método de Jaffe, o

coeficiente de variação (CV) intraensaio e interensaio foi de 1,12% e 2,29%, respectivamente. Para o método enzimático, o CV foi de 0,68% (intraensaio) e 1,71% (interensaio).

Os resultados dos dois ensaios, tanto na comparação em adultos, quanto nas crianças, foram avaliados quanto à sua concordância (gráfico de Bland-Altman e coeficiente Kappa, respectivamente) e correlação (correlação de Pearson). Na análise de Bland-Altman, não foi considerado um método específico de referência, sendo os limites de concordância estabelecidos pela média entre os dois métodos. Para comparação entre os grupos etários também foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras não-paramétricas. Todas as análises foram realizadas no *software* SPSS, considerando um nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

Os resultados do estudo de comparação de métodos em adultos estão representados nas Figuras 1 e 2. Os métodos apresentaram uma excelente correlação (Figura 1 – $R=0,99$, $p<0,001$). No gráfico de Bland-Altman (Figura 2) é possível ver que os métodos apresentaram uma boa concordância, estando somente 3 resultados fora dos limites aceitáveis.

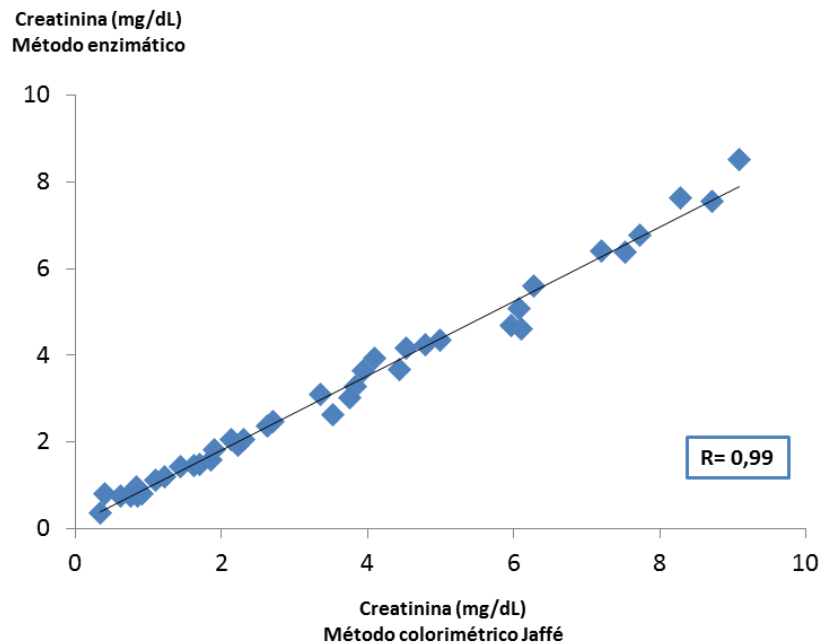


Figura 1 – Correlação ($N=40$) entre os métodos de creatinina enzimática e Jaffe ($R=0,99$, $p<0,001$) nos adultos. O eixo Y representa a creatinina Labtest e o eixo X a creatinina Roche.

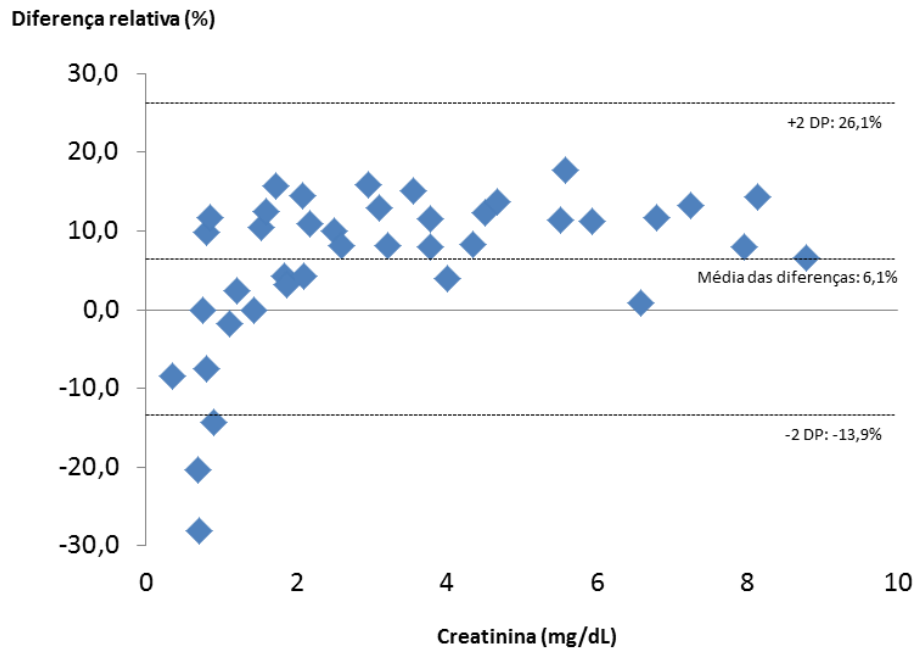


Figura 2 – Gráfico de Bland-Altman para análise da concordância entre os métodos de creatinina enzimática e Jaffe. A linha sólida ilustra o ponto zero, e a linha central pontilhada a média das diferenças relativas entre os métodos (6,1%). As linhas pontilhadas superior e inferior mostram o limite de concordância de 95% (-13,9% e a 26,1%).

Para avaliar os métodos de creatinina nos pacientes pediátricos, analisamos 132 participantes entre crianças e adolescentes, com idade entre 30 dias e 17 anos. Destes, 71 (53,9%) eram do sexo feminino; a etnia dos participantes foi informada pelos responsáveis no questionário (Apêndice A) aplicado sendo 93 (70,5%) declarados brancos; 22 (16,7%) declarados negros e 17 (12,9%) declarados pardos. A altura dos pacientes foi de 1,3m (0,5m – 1,8m), expresso como mediana (mínimo – máximo). Os resultados de creatinina e TFG estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Descrição geral dos pacientes.

N	132
Creatinina (Jaffe)	0,43 (0,17 – 2,41)
Creatinina (Enzimático)	0,61 (0,28 – 3,69)
TFG - Schwartz Bedside (Jaffe)	75,0 (21,42 – 75,0)
TFG - Schwartz Bedside (Enzimático)	75,0 (13,99 – 75,0)

Dados apresentados em mediana (mínimo e máximo).
Valores de creatinina em mg/dL e TFG em ml/min/1,73m²

Foi encontrada uma correlação moderada (Figura 3 - $R= 0,73$; $p <0,001$) entre os métodos de creatinina nas crianças deste estudo. Na análise de comparação entre as faixas etárias (Quadro 1), encontramos diferença significativa nos níveis de creatinina em todos os grupos (Figura 4).

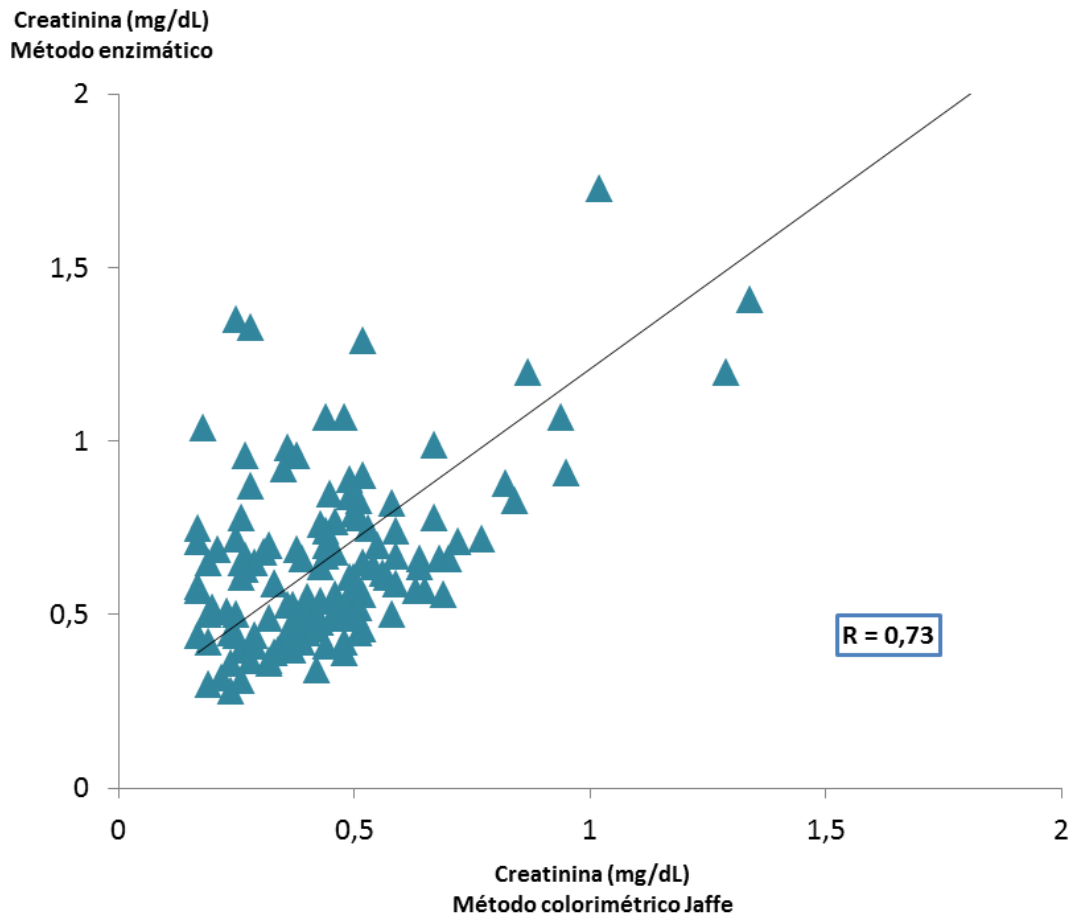


Figura 3 – Correlação ($N=132$) entre os métodos de creatinina (mg/dL) enzimática e Jaffe ($R= 0,73$, $p <0,001$) nas crianças. O eixo Y representa a creatinina Labtest e o eixo X a creatinina Roche.

Quadro 1 – Grupos etários das crianças

Idade	N
0 a 2 anos	31 (23,5%)
3 a 7 anos	25 (18,9%)
8 a 12 anos	42 (31,8%)
13 a 17 anos	34 (25,8%)

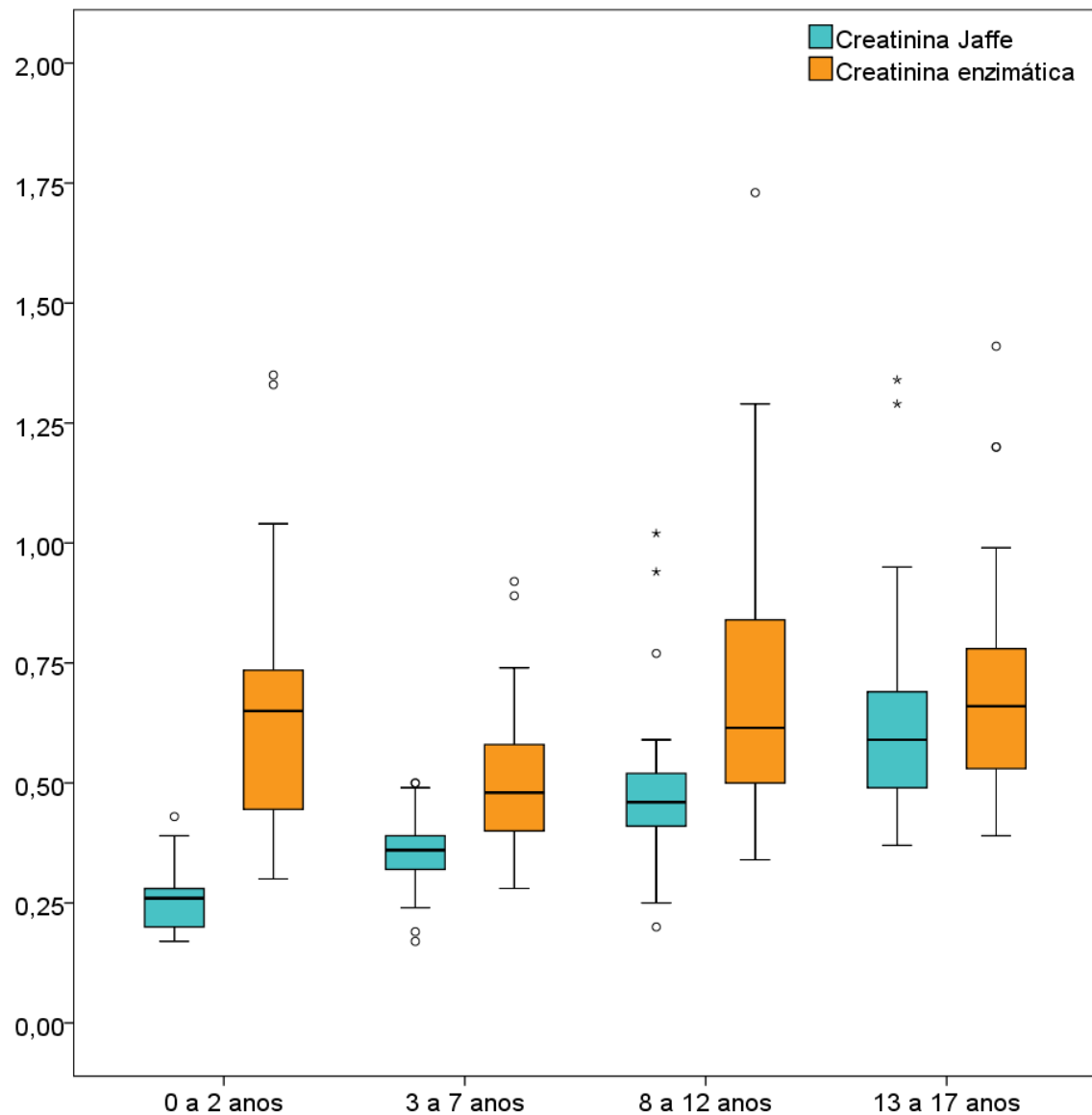


Figura 4 – Níveis de creatinina (eixo Y, em mg/dL) avaliados pelos métodos colorimétrico de Jaffe (caixa verde) e enzimático (caixa laranja), de acordo com a faixa etária (eixo X). Houve diferença significativa entre os níveis creatinina dos dois métodos em todas as faixas avaliadas ($p < 0,001$, teste de Wilcoxon).

Ainda avaliando os dois métodos de creatinina por faixa etária, encontramos que, no grupo de 0 a 2 anos, os métodos mostraram uma correlação muito fraca e sem significância estatística ($R = 0,11$; $p = 0,557$), com uma diferença de 82% entre os resultados (*diferença relativa = creatinina de Jaffe – creatinina enzimática * 100 / média entre Jaffe e enzimático*). Já nas crianças de 3 a 7 anos, os métodos apresentaram uma correlação fraca à moderada, embora significativa ($R = 0,46$; $p = 0,019$), e a diferença relativa entre os resultados foi de 37%. Na faixa etária de 8 a 12 anos, encontramos uma correlação forte entre os métodos ($R = 0,90$; $p < 0,001$), com uma diferença relativa de 32%. Por fim, nos adolescentes de 13 a 17

anos, a correlação entre os métodos foi forte ($R= 0,85$; $p <0,001$) e a diferença nos resultados de 9% (gráficos não apresentados).

A concordância na eTFG pela fórmula de *Schwartz Bedside* entre os dois ensaios está descrita na tabela 2. Houve uma concordância mediana entre os métodos quando avaliado 5 categorias de função renal ($Kappa= 0,25$; $p <0,001$), passando à uma concordância moderada quando avaliado binariamente como normal ou alterada ($Kappa= 0,43$; $p <0,001$).

Tabela 2 – Concordância na estimativa da TFG pela fórmula de *Schwartz Bedside* entre os dois métodos (N=101, >2 anos).

TFG (ml/min/1,73m ²)	Schwartz (Jaffe)	Schwartz (Enzimática)	Kappa
TFG Normal (≥ 75)	95	80	0,25*
TFG com redução leve (60 – 74)	1	9	
TFG com redução intermediária (30 – 59)	4	11	
TFG com redução grave (15 – 29)	1	0	
Falência renal (<15)	0	1	
TFG (ml/min/1,73m ²)	Schwartz (Jaffe)	Schwartz (Enzimática)	Kappa
TFG Normal (>60)	96	89	0,43*
TFG Alterada (<60)	5	12	

*Valor de $p <0,001$

4. DISCUSSÃO

Neste estudo foi observado que, em amostras de indivíduos adultos livres de interferentes, os resultados de creatinina dosados pelos métodos colorimétrico e enzimático se mostraram concordantes e com excelente correlação. Já no grupo pediátrico, a correlação geral foi moderada, e evidenciamos uma progressiva perda de associação e concordância entre os métodos com a diminuição da idade, sendo a faixa etária de 0 a 2 anos a mais afetada. De um modo geral, os níveis de creatinina enzimática foram maiores em comparação à colorimétrica. Além disso, foi observado uma baixa concordância na eTFG entre os métodos em crianças e adolescentes, quando aplicado a fórmula de *Schwartz Bedside*.

O método colorimétrico de Jaffe, descrito em 1886, é o mais amplamente utilizado pelos laboratórios para dosagem de creatinina, devido a sua simplicidade e baixo custo [5],

[6]. Baseia-se na formação de complexos cromogênicos, produtos da reação entre ácido pícrico e a creatinina da amostra em meio alcalino. Sabe-se, porém, que além da creatinina, outros compostos endógenos como proteínas, lipídeos, acetato, etc. são capazes de reagir com picrato alcalino superestimando a dosagem do biomarcador [26]. Além disso, este método apresenta importantes interferentes analíticos (bilirrubina, hemólise, hemoglobina fetal, lipemia, etc.) [27]. O método enzimático, por sua vez, apresenta vantagem analítica com relação ao Jaffe, uma vez que este não sofre influência das proteínas séricas, além de ser menos suscetível a outros interferentes como bilirrubina e hemólise [23], [28]. Apresenta também maior especificidade em função da sua metodologia, a qual consiste no uso de enzimas como creatinina amidohidrolase, creatina amidohidrolase e sarcosina oxidase, associadas a reação de Trinder, onde peróxido de hidrogênio ou amônio são usados na formação de cromógenos [6], [28], [29]. Apesar das vantagens, é um ensaio mais caro, fazendo com que muitos laboratórios ainda optem pelo uso do método colorimétrico.

Avaliando os dois métodos, foi encontrada uma precisão satisfatória em ambos os ensaios, estando os coeficientes de variação analíticos dentro dos limites aceitáveis descritos nos respectivos kits. Referente à avaliação dos métodos em amostras de adultos, encontramos excelente correlação entre os resultados, que apresentaram também boa concordância na ausência de interferentes pré-analíticos (hemólise, lipemia, icterícia). Cheuiche et al., em sua comparação entre os ensaios colorimétrico e enzimático em pacientes adultos, encontraram uma forte correlação no grupo de indivíduos saudáveis ($R= 0,90$), além de adequada concordância nos resultados (diferença relativa inferior à 10% em 63 dos 70 pacientes avaliados), o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho [18].

Na análise por Bland-Altman nos adultos, três amostras se comportaram fora dos limites de concordância preconizados. Contudo, de acordo com os critérios do *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA) [30], utilizado por muitos laboratórios, é clinicamente aceitável variações de até 15% ou 0,3 mg/dL de creatinina. Deste modo, mesmo fora dos limites de concordância, a variação nestes resultados se encontra na faixa aceitável pelo CLIA, não atribuindo impacto clínico significativo. Diante disso, podemos inferir que, para determinação das concentrações séricas de creatinina em pacientes adultos, não há diferença analítica importante entre os dois métodos de dosagem, quando não forem considerados os interferentes metodológicos. Seriam necessários mais estudos para avaliar se na presença de interferentes haveria diferença significativa entre as metodologias.

É descrito que a bilirrubina representa um importante interferente negativo na reação de Jaffe [31]. Níveis elevados de bilirrubina são facilmente encontrados em neonatos, por consequência do aumento na hemólise de eritrócitos, em vista do menor tempo de vida das hemácias e maior hematócrito encontrado em recém-nascidos, em comparação aos adultos [32]. Além disso, situações clínicas como a incompatibilidade do tipo sanguíneo entre a mãe e o bebê também podem induzir a um aumento na hemólise neonatal [33], [34]. A bilirrubina uma vez liberada oxida-se à biliverdina em meio alcalino, o que diminui a intensidade de cor da reação de Jaffe, alterando a quantificação da creatinina [26]. Neste estudo, nós excluimos as amostras ictericas nos nossos pacientes, com a finalidade de evitar essa interferência.

Apesar da concordância no grupo dos adultos, é descrito na literatura que a creatinina sérica dosada a partir do método de Jaffe corresponde a uma importante fonte de erro na determinação da TFG em crianças, especialmente em menores de 2 anos [13], [36]. Em concordância, nossos resultados demonstraram uma maior diferença entre os métodos em crianças na faixa etária de 0 a 2 anos, estando o erro relativo nas dosagens de creatinina em 82% neste grupo. Essa grande fonte de variação deve-se ao fato de que o ensaio de Jaffe sofre importante influência positiva de proteínas séricas, exigindo o uso de correções que diminuam o efeito dos cromógenos não creatínicos. Contudo, em crianças, a amplitude dessa interferência é superestimada, considerando que esses pacientes apresentam concentrações de proteínas naturalmente menores [18]. Randers et al. demonstrou a relação direta entre idade e creatinina, apontando que, após os primeiros dias de vida, há um declínio nas concentrações do biomarcador associada a baixa massa muscular e pequena síntese de creatinina [32], [36].

As correções para rastreabilidade e para reações inespecíficas, somadas aos interferentes do próprio método, dificultam a veracidade dos resultados de creatinina em crianças, podendo prejudicar o diagnóstico e tratamento adequado das disfunções renais nessa população. Atualmente, a eTFG é a forma mais recomendada para avaliação da função renal, consistindo no uso de fórmulas que consideram características como sexo, idade, etnia, massa corpórea e níveis séricos de marcadores endógenos [4]. Portanto, a precisão diagnóstica depende diretamente da acurácia do método de dosagem. Estudos recentes apontam que a aplicação da fórmula de *Schwartz* original, antes comumente utilizada em crianças e adolescentes, acarreta em uma superestimação de 20% a 40% da TFG, quando utilizado métodos de dosagem de creatinina rastreáveis ao IDMS [39]. Essa interferência mostra-se maior nas crianças menores de 2 anos [39]. Em 2009, foram propostas modificações nesta fórmula, baseado em um método enzimático rastreável ao IDMS. Esta equação modificada foi

chamada “*Bedside*” *Schwartz*, e se tornou a mais recomendada para estimar TFG em crianças e adolescentes [13].

Em nosso estudo, a avaliação do grupo pediátrico mostrou uma correlação mediana entre os métodos quando considerado o número total de pacientes. Contudo, a comparação entre as dosagens evidenciou níveis séricos de creatinina mais elevados com o uso do método enzimático em todas as faixas etárias avaliadas. Esse comportamento era esperado, pelo fato das proteínas séricas serem fisiologicamente menores nas crianças [37], [40], como já previamente discutido. Entretanto, era desconhecido o impacto dessa interferência nas faixas etárias. Avaliando a figura 4 deste estudo, é possível perceber que no grupo de 13 a 17 anos, embora também tenha mostrado diferença positiva e significativa nos níveis de creatinina entre os métodos, a distribuição dos resultados foi mais similar em relação à mediana e dispersão, em comparação às outras faixas etárias.

Em relação à classificação da função renal pela TFG, os resultados obtidos nesse estudo mostraram que, com o uso da fórmula *Schwartz Bedside*, houve uma baixa concordância na categorização do grau de comprometimento renal pela TFG entre os métodos. Esse comportamento foi similar quando utilizado como referência 5 grupos de classificação (seguindo as recomendações da KDIGO), ou 2 grupos (inferior ou superior a $60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$) [4], [37] (KDIGO,2012). Discordância semelhante foi observada em Hoste et al. na comparação entre diferentes métodos de dosagem de creatinina (Jaffe calibrado, Jaffe sem calibração, enzimático e química seca) sendo o enzimático aquele que apresentou menor variabilidade e bias na faixa de concentrações mais baixas. [41]

Com este estudo foi possível demonstrar que existe discordância entre os métodos de dosagem de creatinina na avaliação de crianças e adolescentes, em todas as faixas etárias, e também que essa diferença pode interferir na eTFG, fornecendo informações imprecisas a respeito da função renal dos pacientes. Entretanto, como não utilizamos um método de referência para obter a eTFG, não foi possível concluir qual dos dois métodos avaliados foi mais correto para classificação do grau de comprometimento renal, somente que existe discordância entre eles. Pode-se somente inferir que o enzimático tenha sido mais adequado, levando em consideração as informações existentes na literatura científica. Em contrapartida, um dos pontos fortes deste estudo foi a avaliação de pacientes pediátricos da rotina assistencial de um hospital universitário, em diferentes faixas etárias, o que permitiu visualizar de forma mais clara o grau de discordância em cada grupo. Somado a isso, outro

ponto forte foi a avaliação da TFG através da fórmula *Schwartz Bedside*, atualmente recomendada em diretrizes internacionais para uso em crianças.

5. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou uma importante diferença entre a quantificação da creatinina pelos métodos enzimático e colorimétrico de Jaffe, o que acarreta em impacto clínico na avaliação da função renal de pacientes pediátricos. É de suma importância que os laboratórios assistenciais estejam cientes das características analíticas de seus testes, possibilitando que escolham aquele mais adequado para o seu perfil de clientes. Além disso, é essencial que o corpo clínico também conheça as vantagens e limitações dos métodos de análise, para que não ocorram interpretações errôneas dos resultados laboratoriais, implicando no diagnóstico e tratamento dos pacientes.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- [1] D. S. Sesso, Ricardo de Castro Cintra *et al.*, “Report of the Brazilian Chronic Dialysis Census 2012,” *Brazilian J. Nephrol.*, vol. 36, no. 1, pp. 48–53, 2014.
- [2] M. P. Augusto Cesar Soares dos Santos Junior *et al.*, “Prevalence of patients receiving publicly funded renal replacement therapy in Brazil: regional inequities and costs,” 2016. [Online]. Available: <https://www.theisn.org/education/education-topics/hemodialysis/item/2412-prevalence-of-patients-receiving-publicly-funded-renal-replacement-therapy-in-brazil-regional-inequities-and-costs>. [Accessed: 06-May-2018].
- [3] M. F. C. de Camargo *et al.*, “Cost analysis of substitutive renal therapies in children,” *J. Pediatr. (Rio. J.)*, vol. 94, no. 1, pp. 93–99, Jan. 2018.
- [4] KDIGO, “KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease KDIGO 2012,” *Off. J. Int. Soc. Nephrol.*, vol. 3, no. 1, 2013.
- [5] G. M. Kirsztajn, “Avaliação de Função Renal.” *J. Bras. Nefrol.*, v.31, (Supl 1), pp. 14–20, 2009.
- [6] A. Skurup, T. Kristensen, G. Wennecke “New creatinine sensor for point-of-care testing of creatinine meets the National Kidney Disease Education Program,” *Clin Chem Lab Med*, vol. 46, no. 1, pp. 3–8, 2008.
- [7] J. P. Kooman, “Estimation of renal function in patients with chronic kidney disease,” *J. Magn. Reson. Imaging*, vol. 30, no. 6, pp. 1341–1346, Dec. 2009.
- [8] M. V. Rocco, V. M. Buckalew, Jr., L. C. Moore, and Z. K. Shihabi, “Measurement of Glomerular Filtration Rate Using Nonradioactive Iohexol: Comparison of Two One-Compartment Models,” *Am. J. Nephrol.*, vol. 16, no. 2, pp. 138–143, 1996.
- [9] S. C. Brown and P. H. O’Reilly, “Iohexol clearance for the determination of glomerular filtration rate in clinical practice: evidence for a new gold standard.,” *J. Urol.*, vol. 146, no. 3, pp. 675–9, Sep. 1991.
- [10] R. D. Perrone *et al.*, “Utility of radioisotopic filtration markers in chronic renal insufficiency: simultaneous comparison of ¹²⁵I-iothalamate, ¹⁶⁹Yb-DTPA, ^{99m}Tc-DTPA, and inulin. The Modification of Diet in Renal Disease Study.,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 16, no. 3, pp. 224–35, Sep. 1990.
- [11] E. Krutzén, S. E. Bäck, I. Nilsson-Ehle, and P. Nilsson-Ehle, “Plasma clearance of a new contrast agent, iohexol: a method for the assessment of glomerular filtration rate.,” *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 104, no. 6, pp. 955–61, Dec. 1984.

- [12] Kirsztajn, Gianna Mastroianni; Romão Jr, J.E; Bastos, M.G; Meyer,F; Andrda, N.C, Projeto Diretrizes: “Doença Renal Crônica (Pré-terapia Renal Substitutiva): Diagnóstico.”, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2011.Disponível em:
<https://diretrizes.amb.org.br/_BibliotecaAntiga/doenca_renal_cronica_pre_terapia_renal_substitutiva_diagnostico.pdf> Acesso em: 6 maio 2018.
- [13] G. J. Schwartz *et al.*, “New equations to estimate GFR in children with CKD.,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, no. 3, pp. 629–37, Mar. 2009.
- [14] A. S. Levey *et al.*, “ A More Accurate Method To Estimate Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine: A New Prediction Equation,” *Ann. Intern. Med.*,vol. 130, no 6, pp. 461-70, 1999.
- [15] A. S. Levey *et al.*, “A new equation to estimate glomerular filtration rate.,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 150, no. 9, pp. 604–12, May 2009.
- [16] D. W. Cockcroft and H. Gault, “Prediction of Creatinine Clearance from Serum Creatinine,” *Nephron*, vol. 16, no. 1, pp. 31–41, 1976.
- [17] H. Abensur, “Biomarcadores na Nefrologia.”, Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2011. Disponível em: arquivos.sbn.org.br/pdf/biomarcadores.pdf. Acesso em: junho 2018.
- [18] A. V. Cheuiche, A. A. Soares, E. G. Camargo, L. S. Weinert, J. L. Camargo, and S. P. Silveiro, “Comparison between IDMS-traceable Jaffe and enzymatic creatinine assays for estimation of glomerular filtration rate by the CKD-EPI equation in healthy and diabetic subjects,” *Clin. Biochem.*, vol. 46, no. 15, pp. 1423–1429, 2013.
- [19] N. G. Dodder, S. S.-C. Tai, L. T. Sniegoski, N. F. Zhang, and M. J. Welch, “Certification of Creatinine in a Human Serum Reference Material by GC-MS and LC-MS,” *Clin. Chem.*, vol. 53, no. 9, pp. 1694–1699, Sep. 2007.
- [20] L. Piéroni, A.-S. Bargnoux, J.-P. Cristol, E. Cavalier, and P. Delanaye, “Did Creatinine Standardization Give Benefits to the Evaluation of Glomerular Filtration Rate?,” *EJIFCC*, vol. 28, no. 4, pp. 251–257, Dec. 2017.
- [21] K. Allegaert *et al.*, “Enzymatic isotope dilution mass spectrometry (IDMS) traceable serum creatinine is preferable over Jaffe in neonates and young infants,” *Clin Chem Lab Med*, vol. 52, no. 6, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-1035>
- [22] R. L. Schmidt, J. A. Straseski, K. L. Raphael, and A. H. Adams, “A Risk Assessment of the Jaffe vs Enzymatic Method for Creatinine Measurement in an Outpatient Population,” *Plos One*, vol. 29, pp. 1–21, 2015. Doi: 10.1371/journal.pone.0143205
- [23] G. A. Moss, R. J. L. Bondar, and D. M. Buzzelli, “Kinetic Enzymatic Method for

- Determining Serum Creatinine,” *Clin. Chem.*, vol. 21, no. 10, pp. 1422–1426, 1975.
- [24] Sociedade Brasileira de Patologia Clínica, Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Automação laboratorial: histórico, seleção, implantação e gestão., *Manole*, 2018th ed. Barueri, SP, Brasil.
- [25] G. J. Schwartz and S. L. Furth, “Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease,” *Pediatr. Nephrol.*, vol. 22, no. 11, pp. 1839–1848, Sep. 2007.
- [26] M. Perazzi, Beatriz; Angerosa, “Creatinina en sangre : calidad analítica e influencia en la estimación del Índice de Filtrado Glomerular Creatinine in blood : analytical quality Glomerular Resumen,” *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.*, vol. 45, no. 2, pp. 265–272, 2011.
- [27] C. M. Cobbaert, H. Baadenhuijsen, and C. W. Weykamp, “Prime Time for Enzymatic Creatinine Methods in Pediatrics,” *Clin Chem* vol. 55, no. 3, pp. 549–558, 2009.
- [28] M. Suzuki and M. Yoshida, “A new enzymatic serum creatinine measurement based on an endogenous creatine-eliminating system,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 143, pp. 147–155, 1984.
- [29] P. Fossati, M. Ponti, G. Passoni, G. Tarengi, G. V Melzi d’Eril, and L. Prencipe, “A step forward in enzymatic measurement of creatinine.,” *Clin. Chem.*, vol. 40, no. 1, pp. 130–7, Jan. 1994.
- [30] A. V. Cheuiche, A. A. Soares, E. G. Camargo, L. S. Weinert, J. L. Camargo, and S. P. Silveiro, “Comparison between IDMS-traceable Jaffe and enzymatic creatinine assays for estimation of glomerular filtration rate by the CKD-EPI equation in healthy and diabetic subjects,” *Clin. Biochem.*, vol. 46, no. 15, pp. 1423–1429, 2013.
- [31] Clinical and Laboratory Standards Institute. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP15-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2005.
- [32] M. Peake and M. Whiting, “Measurement of Serum Creatinine – Current Status and Future Goals,” *Clin Biochem*, vol. 27, pp. 173–184, 2006.
- [33] E. Den Bakker, R. J. B. J. Gemke, and A. Bökenkamp, “Endogenous markers for kidney function in children: a review,” *Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences*, vol. 55, no. 3, pp. 163-183, 2018.
- [34] P. A. Dennery, D. S. Seidman, and D. K. Stevenson, “Neonatal Hyperbilirubinemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 344, no. 8, pp. 581–590, Feb. 2001.

- [35] V. K. Bhutani *et al.*, “Neonatal hyperbilirubinemia and Rhesus disease of the newborn: incidence and impairment estimates for 2010 at regional and global levels.,” *Pediatr. Res.*, vol. 74 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. 86–100, Dec. 2013.
- [36] L. Copelovitch, B. A. Warady, and S. L. Furth, “Insights from the chronic kidney disease in children (CKiD) study,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 6, no. 8, pp. 2047–2053, 2011.
- [37] E. Randers, S. Krue, E. J. Erlandsen, H. Danielsen, and L. G. Hansen, “Reference interval for serum cystatin C in children,” *Clin. Chem.*, 1999.
- [38] G. L. Myers *et al.*, “Recommendations for Improving Serum Creatinine Measurement : A Report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program,” *Clin. Chem*, vol. 18, pp. 5–18, 2006.
- [39] G. J. Schwartz and D. F. Work, “Measurement and estimation of GFR in children and adolescents,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 4, no. 11, pp. 1832–1843, 2009.
- [40] Orakzai et al. Serum proteins in infants. *Journal Of Pakistan Medical Association* Pages with reference to book, From 251 To 255.
- [41] Hoste et al. Routine serum creatinine measurements: how well do we perform? *BMC Nephrology* (2015) 16:21. doi:10.1186/s12882-015-0012-x.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foram contemplados os objetivos propostos sendo possível verificar que em pacientes pediátricos o uso do método colorimétrico de Jaffe na dosagem de creatinina resulta em valores séricos deste biomarcador mais baixos quando comparados com o método enzimático e que esta diferença se reflete na eTFG, representada pela discordância encontrada, através da comparação deste parâmetro, na categorização dos pacientes quanto ao grau de prejuízo renal. A estratificação por faixa etária, corresponde a um dos pontos fortes deste estudo, permitindo associar os diferentes graus de discordância nas dosagens de creatinina com a idade dos pacientes e a características fisiológicas inerentes das mesmas. Dado o caráter de progressão silencioso dos distúrbios renais e a sensibilidade de pacientes pediátricos a desequilíbrios homeostáticos se faz de suma importância o uso de técnicas mais precisas que conduzam de forma mais assertiva ao diagnóstico seguro e tratamento adequado. Trabalhos prévios já demonstraram a vantagem analítica do método enzimático quanto a sua maior especificidade e menor suscetibilidade a interferentes, e somado a isso, o fato de a fórmula preconizada para estimação da TFG ter sido baseada neste método serve como um incentivo ainda maior para o uso do ensaio enzimático nos pacientes pediátricos.

É importante ressaltar que nesta avaliação não foram analisadas amostras com interferentes pré-analíticos, portanto, podemos apresentar como perspectivas futuras a análise do impacto desses interferentes no grupo pediátrico na avaliação da função renal quando realizadas dosagens pelo método de Jaffe e o enzimático e, da mesma forma, investigar o grau de concordância na estimativa da taxa de filtração glomerular.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, E.R.; RIBEIRO, P.S.; CARVALHO, S.F.D. Creatina: metabolismo e efeitos de sua suplementação sobre o treinamento de força e composição corporal. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo v. 3, n. 13, p. 63-69. Janeiro/Fevereiro, 2009. ISSN 1981-9927.

ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA.

Projeto Diretrizes - Doença Renal Crônica (Pré-terapia Renal Substitutiva): Diagnóstico.

Editores: Kirsztajn G.M.; Souza E.; Romão Jr J.E.; Bastos M.G.; Meyer F.; Andrada N.C.

Publicado em 30 junho 2011. Disponível em:

<https://diretrizes.amb.org.br/_BibliotecaAntiga/doenca_renal_cronica_pre_terapia_renal_substitut_diagnostico.pdf> Acesso em: 6 maio 2018.

BASTOS, M.G., BASTOS, R.M.R., PAULA, R.B. Avaliação da função renal. Em Barros E, Gonçalves LF (Eds). Nefrologia no consultório. **Artmed**, Porto Alegre, 2007, pp 49-67

BERG, K.J. et al. Renal effects of trimethoprim in ciclosporin- and azathioprine-treated kidney allografted patients. **Nephron.**, [S.I] v. 53, no. 3, p. 218-22. 1989.

BRITO, T. N. S.; OLIVEIRA, A. R. A.; SILVA, A. K. C. da. Taxa de filtração glomerular estimada em adultos: características e limitações das equações utilizadas. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, Rio de Janeiro. Artigo aprovado em 03/02/2016. Disponível em:

<<http://www.rbac.org.br/artigos/taxa-de-filtracao-glomerular-estimada-em-adultos/>>. Acesso em: 11 dez 2018.

CHEUCHE, A. et al. Comparison between IDMS-traceable Jaffe and enzymatic creatinine assays for estimation of glomerular filtration rate by the CKD-EPI equation in healthy and diabetic subjects. **Clin. Biochem.**, Toronto, v. 46, no. 15, p. 1423-1429, 2013.

COCKCROFT, D.M; GAULT, M. H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. **Nephron.**, [S. l.], v. 16, no. 1, p. 31-41, 1976.

COSTALLAT, B. L. et al. Resistência à insulina com a suplementação de creatina em animais de experimentação. **Rev Bras Med do Esporte**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 26–30, 2007.

DEN BAKKER, E.; GEMKE, R. J. B. J.; BÖKENKAMP, A. Endogenous markers for kidney function in children: a review. **CRC Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences**, [S.l.], v. 55, n. 3, p.163-183, fev. 2018.

DODDER, N.G. et al. Certification of Creatinine in a Human Serum Reference Material by GC-MS and LC-MS. **Clin. Chem.**, New York. v. 53, no. 9, p. 1694 –1699, 2007.

FERREIRA, L.G. Papel do sistema da fosfocreatina na homeostase energética das musculaturas esquelética e cardíaca. **Einstein.**, Espírito Santo, v. 12, no. 1, p. 126-31. 2014. DOI: 10.1590/S1679-45082014RB2741

KIMMEL, P.L.; LEW, S.Q.; BOSCH, J.P. Nutrition, ageing and GFR: is age-associated decline inevitable? **Nephrol Dial Transplant.**, [S.I.], v. 11, suppl 9, p. 85-88. 1996. (1996)

KIRSZTAJN, G. M. Avaliação da função renal. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo. v.31, (Supl 1):14-20, 2009.

KONSTANTYNER, T. et al. Pediatric Chronic Dialysis in Brazil: Epidemiology and Regional Inequalities. **PLoS ONE**. San Francisco. v. 10, no. 8, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0135649>>

KOOMAN, J.P. Estimation of renal function in patients with chronic kidney disease. **Magn Reson Imaging.**, v. 30, no. 6, p. 1341-6. Dez 2009. DOI: 10.1002/jmri.21970

LEVEY, A.S. et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. **Ann Intern Med**. Philadelphia. v.13; no.6, p. 461-70. 1999.

LEVEY, A. S. et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Ann Intern Med.**, [S.l.] v.150, no. 9, p. 604-12. 2009.

NAH, H. et al. Evaluation of bilirubin interference and accuracy of six creatinine assays compared with isotope dilution-liquid chromatography mass spectrometry. **Clin Biochem.**, [S.l.], v. 49, no. 3, p. 274-81. Feb 2016

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. Kidney Disease: Improving Global Outcomes KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney Int.** [S.l.], Suppl 3:100 – 150. 2013.

NIGAM, P. K; CHANDRA, A. Positive and negative false estimates of serum creatinine. **Interv. Cardiol.**; India; v 9, no 4, p.163–167, 2017.

MOSS, G. A.; BONDAR, R. J. L.; BUZZELLI, D. M. “Kinetic Enzymatic Method for Determining Serum Creatinine,” **Clin. Chem.**, v. 21, no. 10, p. 1422–1426, 1975.

OTUKESH, H. et al. Glomerular function in neonates. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, [S. l.], v. 6, no 3, p. 166–172, 2012.

PANTEGHINI, M. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC): Enzymatic assays for creatinine: time for action. **Clin Chem Lab Med.**; [S.l.]; v.46, no 4, p. 567–572, 2008. DOI 10.1515/CCLM.2008.113

PERAZZI, B.; ANGEROSA, M. Creatinine in blood: analytical quality and influence on the estimation of Glomerular Filtration. **Acta Bioquím Clín Latinoam.**, [S.I] v. 45, no. 2, p. 265-272. 2011.

PIÉRONI, L.; et al. Did Creatinine Standardization Give Benefits to the Evaluation of Glomerular Filtration Rate? **J. Int. Fed. Clin. Chem. Lab. Med.**, [S.l.], v. 28, no. 4, p. 251-257, Dec. 2017.

PORTO, J. R. et al. Evaluation of Renal Function in Chronic Kidney Disease. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, [S. l.], v. 49, no 1, p. 26–35, 2017.

RECOMENDAÇÕES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL (SBPC/ML): Automação laboratorial: histórico, seleção, implantação e gestão. Barueri, SP; Manole; 2018.

ROMÃO, E. Doença Renal Crônica : Definição , Epidemiologia e Classificação. **J Bras Nefrol**, [S. l.], v. XXVI, no 3, 2004.

SAMRA, M.; ABCAR, A. C. False Estimatives of Elevated Creatinine. **Perm. J.**, [S.l.], v. 16, no. 2, p. 51-52. 2012.

SANTOS JUNIOR, A. C. S. dos et al. Prevalence of patients receiving publicly funded renal replacement therapy in Brazil: regional inequities and costs. **Open Urol. Nephrol. J.**, [S.l.], v. 10, no 1, p. 34-40.

SCHWARTZ, G. J.; BRION, L. P.; SPITZER, A. The use of plasma creatinine concentration for estimating glomerular filtration rate in infants, children, and adolescents. **Pediatr Clin North Am.**, Philadelphia. v. 34, no. 3, p. 571-590. 1987.

SCHWARTZ, G. J. et al. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. **Pediatrics**. Evanston. v. 58, no. 2, p. 259-263. 1976.

SCHWARTZ, G.J. et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. **J Am Soc Nephrol**. Baltimore. v. 20, no. 3, p. 629 - 637. 2009.

SESSO, R. C. C. et al. Report of the Brazilian Chronic Dialysis Census 2012. **J. bras. nefrol.**, [s. l.], v. 36, no 1, p. 48–53, 2014.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C.C.. Evaluation of renal function and damage: a laboratorial challenge. **J Bras de Patol e Med Lab**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 329–337, 2007.
Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541937005>>. Acesso em: 6 maio 2018.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and Creatinine Metabolism. **Physiol Rev.**, U.S.A v. 80, no. 3. p. 1107-82. Jul 2000. DOI: 10.1016/0346-251X(87)90063-7

APÊNDICE A – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS
QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

Data e local do recrutamento: _____

Nome do voluntário: _____

Nome do pai/mãe/ou responsável legal: _____

Nome do pesquisador responsável pela entrevista: _____

Dados do voluntário

Data de nascimento: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Etnia: _____ Altura: _____ Peso: _____ IMC: _____

Qual o motivo para os exames laboratoriais do paciente?

Rotina/"check up"

Monitoramento médico (qual condição/doença)? _____)

Investigação médica (qual condição/doença)? _____)

Outros: _____

O participante utilizou alguma medicação/vitaminas na semana deste exame? Alguma destas medicações/vitaminas é de uso contínuo? Se sim, qual(is)?

O participante pratica exercícios físicos? Se sim, qual(is) tipo e frequência? _____

O participante desta pesquisa apresenta/já apresentou alguma destas condições clínicas:

Doença renal Hipertireoidismo Hipotireoidismo Câncer

Diabetes Hipertensão arterial Doenças autoimunes Sepsis, tuberculose

Comentários sobre as condições clínicas acima ou outras relatadas (especificações do tipo de doença, histórico, ou informação relevante): _____

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CLINICAL BIOCHEMISTRY

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for

review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the

Internet)

- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare

- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html> ;

Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals <http://www.icmje.org>, published by the International Committee of Medical Journal Editors. This must be stated at an appropriate point in the article

Please note: *Clinical Biochemistry* does not accept submission of papers based on animal studies.

STARD initiative

Clinical Biochemistry supports the STARD initiative on reporting of diagnostic accuracy.

<http://www.stard-statement.org>

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder.

To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list

should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an

'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or

preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the

author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

Elsevier journals comply with current NIH public access policy.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.

- No open access publication fee payable by authors.

- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this

public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be

shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peerreviewed

research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research

funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review

criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative

Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2400**, excluding taxes. Learn more about

Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and

enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances (for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the

consents or evidence that such consents have been obtained. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

A minimum of six suitable potential reviewers must be supplied (please provide their name, email addresses, and institutional affiliation). When compiling this list of potential reviewers please consider the following important criteria: they must be knowledgeable about the manuscript subject area; must not be from your own institution; at least two of the suggested reviewers should be from another country than the authors'; and they should not have recent

(less than four years) joint publications with any of the authors. However, the final choice of reviewers is at the editors' discretion.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the

editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of

two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible

for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Experimental

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about

Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details**

are kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Maximum length of submissions

Full length articles should not exceed 4000 words (maximum 40 references), and up to 6 tables and/or figures with short communications comprising up to 1500 words of text, maximum 15 references, and two illustrative items (Tables and/or Figures). Letters will be classified as Case Reports (provide novel insight into disease mechanisms or diagnostic applications), Laboratory Notes (technical evaluation or important insight into analytical methodology), or Letters to the Editor (focused on a specific article that has appeared in Clinical Biochemistry within 4 weeks of print issue date of article). For all 3 types of letters

listed above, the text should not exceed 500 words, with no abstract, a maximum of 1 table or figure and up to 5 references. Review Articles and Special Reports may exceed the word and reference limit for Full length articles as per the comprehensive nature of these articles. However, both of these articles (Reviews and Special Reports) will still require an abstract (unstructured, 250 word maximum). Editorials and Opinion pieces will not require an abstract and will be limited to 2000 words and up to 20 references.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These Keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the

United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG):

Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG):

Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells. The Editor-in-Chief, on accepting a manuscript, may recommend that additional tables containing important backup data, too extensive to be published in the article, may be published as supplementary material (see below) or deposited with the National Auxiliary

Publications Service or made available by the author(s). In that event, an appropriate statement will be added to the text. Submit such tables for consideration with the manuscript.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and viceversa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by

Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z.

Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Abbreviations and units

Standard abbreviations as listed in the *Council of Biology Editors Style Manual* may be used without definition. Use non-standard abbreviations sparingly, preceding their first use in the text with the corresponding full designation. Use units in conformity with the standard International System (SI) of units.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation

content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file.

Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Supplementary material captions

Each supplementary material file should have a short caption which will be placed at the bottom of the article, where it can assist the reader and also be used by search engines.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect. In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley*

Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be

editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online

version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and

correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>