



HAL
open science

Mise au point et validation d'une méthode de dosage sur microplaques de la créatinine urinaire bovine et porcine

Stéphane Andanson, Alban Berne, Thierry Astruc, Vincent Sapin, Isabelle Rozand

► To cite this version:

Stéphane Andanson, Alban Berne, Thierry Astruc, Vincent Sapin, Isabelle Rozand. Mise au point et validation d'une méthode de dosage sur microplaques de la créatinine urinaire bovine et porcine. Cahier des Techniques de l'INRA, 2005, 54, pp.11-20. hal-02681261

HAL Id: hal-02681261

<https://hal.inrae.fr/hal-02681261v1>

Submitted on 4 Sep 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Mise au point et validation d'une méthode de dosage sur microplaques de la créatinine urinaire bovine et porcine

Stéphane Andanson¹, Alban Berne², Thierry Astruc², Vincent Sapin³, Isabelle Rozand³

Résumé

Produite à un taux constant par l'organisme animal et humain, la créatinine est un catabolite éliminé dans l'urine. Son dosage est d'ailleurs classiquement utilisé pour dépister et suivre, en clinique humaine, les pathologies rénales. La concentration urinaire de créatinine (créatininurie) est aussi utilisée pour normaliser la concentration urinaire d'autres molécules; et ce afin de prendre en compte les possibles phénomènes de concentration ou de dilution inhérents aux différents volumes et fréquences de diurèse. Afin de pouvoir corriger les concentrations de molécules éliminées de façon urinaire chez l'espèce bovine et porcine, nous avons donc adapté et validé un dosage colorimétrique de la créatinine urinaire avec utilisation de microplaques en remplacement des cuves classiques de 1 ml. La justesse de ce dosage a été évaluée en comparant notre méthode (utilisant un volume réduit d'échantillons), à une méthode référence. Les deux méthodes ne sont pas significativement différentes ($P < 0.43$), la justesse est donc acceptable. Les coefficients de variation en répétabilité (CVr) et en reproductibilité (CVR) sont respectivement de 3.13% et de 4.16% pour l'urine bovine et de 5.42% et de 6.56% pour l'urine porcine.

Mots clés : créatinine, urine, dosage colorimétrique, validation et comparaison de méthode, Jaffé.

1. Introduction

Chez un animal soumis à un stress, deux systèmes physiologiques sont principalement activés. Dans un premier temps, le système nerveux autonome produit des catécholamines (adrénaline, noradrénaline), puis l'axe corticotrope prend le relais en libérant à son tour des corticoïdes (cortisol, cortisone). Ces hormones véhiculées par le sang, ont pour rôle principal de faciliter l'adaptation de l'animal aux contraintes auxquelles il est exposé (Mormède, 1990). Après leur action, ces molécules sont éliminées dans l'urine. Leur quantification dans cette matrice permet donc une évaluation objective du niveau de stress subi par l'animal dans les heures précédant le prélèvement. Il faut pour cela tenir compte du fait que ces concentrations sont également dépendantes du taux de dilution de l'urine lié à un taux de réabsorption rénale d'eau plus ou moins important. Cette difficulté peut être contournée en normalisant les concentrations d'hormones en fonction du taux de créatinine libérée dans l'urine de façon constante, et ce en absence de pathologies rénales. Par conséquent, il était indispensable de disposer d'une méthode de dosage de la créatinine urinaire fiable car sa justesse influence

¹ INRA, Unité de Recherches sur les Herbivores, Equipe Adaptation et Comportements Sociaux, Centre de Clermont-Ferrand/Theix, 63122 Saint Genès-Champanelles.

² INRA, Station de Recherche sur la viande, Equipe Biochimie et Physiologie du Muscle, 63122 Saint Genès-Champanelles.

³ Laboratoire de Biochimie Médicale / CHU Gabriel Monpied / 63000 Clermont-Ferrand

fortement la qualité des résultats finaux. L'évaluation de ce critère a constitué une part très importante dans la mise au point et la validation de notre méthode de dosage de la créatinine. Cette problématique préoccupant les équipes « Adaptation et Comportement Sociaux » (Unité de Recherches sur les Herbivores) et « Biochimie et Physiologie du Muscle » (Station de Recherches sur la Viande) du centre INRA de Theix a conduit à une collaboration sur la mise en place, l'optimisation et la validation de cette méthode. Le laboratoire de « Biochimie Médicale » du CHU de Clermont-Ferrand dosant quotidiennement en routine, la créatinine sanguine et urinaire pour diagnostiquer et suivre des pathologies rénales chez l'homme a contribué à la validation de cette méthode. La mise en commun des ressources nous a permis d'implanter sur le site de Theix une méthode fiable et juste du dosage de la créatinine urinaire.

2. matériel et méthodes

2.1. Généralités

Différentes méthodes permettent de doser la créatinine : chromatographique (Okuda et al, 1983), enzymatique (Schneiderka et al, 1993), ou colorimétrique. Cette dernière est la plus couramment utilisée et repose sur la réaction de Jaffé en cinétique dans laquelle une coloration jaune-orange se développe lorsque le métabolite est traité par le picrate en milieu alcalin. L'intensité de la coloration du complexe coloré mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 492 nm est proportionnelle à la concentration de créatinine. Malheureusement, cette réaction présente des défauts de spécificité. Certaines substances présentes dans les milieux biologiques réagissent plus ou moins rapidement que la créatinine avec le picrate alcalin. Le choix d'une mesure réalisée à un temps d'incubation préalablement établi permet d'améliorer sensiblement la spécificité de cette mesure.

2.2. Méthode

Notre choix s'est porté sur une méthode simple à mettre en œuvre, ne nécessitant pas de matériel onéreux et donnant des résultats fiables. Nous avons utilisé un kit de dosage de la créatinine commercialisé par la société BioMérieux (créatine cinétique, référence 61162). Ce kit réactif comporte :

- Une solution de créatinine à concentration connue de 15 mg/l (solution standard ou calibrateur): Sol1
- Une solution d'acide picrique à $2.2 \cdot 10^3$ mg/l (réactif de coloration) : Sol2
- Une solution de soude et de phosphate de sodium (respectivement $1.6 \cdot 10^4$ mg/l et $6.9 \cdot 10^3$ mg/l) : Sol3

Le kit de dosage est initialement conçu pour être utilisé selon un mode opératoire manuel. A 1 ml du mélange réactionnel (mélange volume à volume Sol1 et Sol2) sont ajoutés 100 μ l d'urine diluée au 1/20 : dilution calculée afin de se situer dans les teneurs proches de la concentration de la solution standard. Le zéro est réalisé avec de l'eau distillée. La lecture est réalisée en cuve de 1 ml à 492 nm après 20 s (Densité Optique₁ / DO₁) puis 80 s (DO₂).

La concentration de l'échantillon est alors exprimée en mg/l (1 mg/l équivalent à 8.85 mmol/l), avec le rapport : (Δ DO échantillon / Δ DO étalon) X 15 mg/l X 20

$$\Delta \text{ DO} = \text{DO}_2 - \text{DO}_1$$

2.3. Transposition à un dosage sur microplaques et optimisation de la méthode

Des essais préliminaires nous ont permis de constater que sur des urines d'animaux sains, la valeur de DO mesurée à 20 secondes (DO1) était négligeable. Nous avons donc envisagé ce dosage avec l'utilisation de microplaques (modèle standard 96 puits à fonds plats) bien que plus de 20 secondes soient nécessaires à la distribution des réactifs dans l'ensemble des 96 puits. L'utilisation des plaques 96 puits facilite le dosage qui devient plus rapide et moins onéreux.

En effet, la quantité de chaque réactif a été réduite d'un facteur 3,3 par rapport au protocole d'origine. Ainsi, 30 µl de chaque point de gamme ou d'échantillons d'urine (dilués 20 fois) sont déposés en double dans les puits, puis 300 µl de mélange réactionnel sont ajoutés. Le calcul final des concentrations est effectué à partir d'une seule lecture de DO. Une gamme étalon est également réalisée (avec de la créatinine synthétique Sigma, référence C-4255) permettant le calcul final des teneurs par rapport non plus à un seul point de calibration mais à l'aide d'une équation de droite présentant les concentrations suivantes : 15, 30, 60, 90, 120 et 150 mg/l.

Avant d'effectuer les tests de linéarité et de spécificité pour les espèces bovine et porcine à l'aide de cette méthode transposée sur microplaques, nous avons voulu apprécier l'incidence de la durée d'incubation sur la justesse de cette méthode. Pour cela, nous avons collaboré avec le laboratoire de Biochimie Médicale du CHU de Clermont-Ferrand qui dispose d'un dosage automatisé de la créatinine inscrit dans un réseau de contrôle qualité inter laboratoires. Le principe de la méthode est également basé sur la réaction de Jaffé. Les réactifs utilisés et l'automate (Modular P800) sont commercialisés par la société Roche Diagnostics. Une dizaine d'échantillons d'urines ont été dosés au CHU, puis dans nos conditions expérimentales mais en relevant les DO après 2, 5, 7, 10, 12 minutes d'incubation. Les différents résultats obtenus ont été comparés à ceux du CHU (cf. tableau 1), nous permettant de conclure que les lectures à 10 et 12 minutes d'incubation étaient les plus justes et les moins variables par rapport à la méthode développée au CHU. Les conditions de dosage ont donc été fixées à une seule lecture de DO à 10 minutes d'incubation.

2.4. Validation de la méthode

Pour débiter la validation de la méthode, les critères fondamentaux de linéarité et de spécificité ont été calculés. La justesse de la méthode est habituellement déterminée à l'aide d'un pool d'urines dont la créatinine a été extraite en totalité et dans lequel une quantité définie d'analyte synthétique a été rajoutée. L'absence de moyens techniques permettant l'extraction spécifique de la créatinine du pool d'urines, nous a donc conduit à comparer notre méthode à celle développée au CHU de Clermont-Ferrand (disposant de contrôles de qualité passés de façon quotidienne).

2.4.a. test de linéarité

La linéarité de la méthode a été déterminée en réalisant 5 répétitions des 6 points constituant la gamme étalon (cf. tableau 2). Une analyse de variance permet de définir la part de la linéarité puis de la non linéarité du modèle de régression (cf. tableau 3). Les limites de détection et quantification sont calculées à partir de la sensibilité de la méthode et de la valeur 0 mg/l de la gamme étalon (Feinberg, 1996). Ces limites sont définies dans la norme française NF V03-110 de la façon suivante :

Limite de détection : plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

Limite de quantification : plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions décrites de la méthode.

2.4.b. test de spécificité

La méthode des ajouts dosés a été réalisée pour déterminer la spécificité (NF V 03-110). Cette méthode permet de mettre en évidence des interférences avec la matrice contenant l'analyte à déterminer et les réactifs. En l'absence d'interférence la méthode est jugée spécifique. De la créatinine synthétique identique à celle utilisée pour réaliser la gamme étalon a été ajoutée en quantités croissantes (20, 50, 80 et 100 mg/L) à des échantillons d'urine des espèces bovine et porcine. Un test de Student a été réalisé en comparant la pente de la droite de régression obtenue avec les valeurs des teneurs ajoutées puis celles retrouvées et la valeur 1 de la pente d'une droite de régression théorique (cf. tableau 4). Un test de Student de signification de l'ordonnée à l'origine a également été réalisé pour démontrer que l'ordonnée à l'origine de la droite de régression des valeurs ajoutées et retrouvées n'est pas différente de 0. Ceci permet de démontrer qu'il n'y a pas de biais systématique pour l'évaluation des teneurs.

2.4.c. Evaluation de la fidélité

Pour l'appréciation de la fidélité de la méthode, 8 dosages ont été réalisés dans lesquels un échantillon d'urine bovine et un échantillon d'urine porcine ont été dosés 3 fois (cf. tableaux 5 et 6). Pour chaque échantillon la part de la variabilité induite par les différents dosages a été extraite de la variabilité totale. Cette valeur représente la reproductibilité de la méthode. La variabilité induite par les répétitions réalisées dans chaque dosage a aussi été extraite de la variabilité totale pour exprimer la répétabilité de la méthode.

2.5. Comparaison de méthodes

La réalisation d'une comparaison de méthode a permis simultanément la vérification de la justesse ainsi que la validation de la transposition aux microplaques.

La transposition de méthode a été réalisée en utilisant 5 échantillons d'urine de porcs, de bovins et de patients humains. Chaque échantillon a été dosé 5 fois avec la méthode du laboratoire du CHU de Clermont-Ferrand et 5 fois avec la méthode miniaturisée dans les conditions d'optimisation que nous avons définies.

Une analyse de la variance a été réalisée avec le résultat de ces dosages de façon à comparer les moyennes obtenues pour l'ensemble des échantillons et cela pour chacune des deux méthodes, ainsi que la comparaison des moyennes des échantillons de chaque matrice (cf. tableau 6).

2.6. Analyse statistique des données

Pour la détermination des critères de linéarité, spécificité et fidélité un outil élaboré par A.Thomas et Y.Anglaret à l'INRA de Theix dans l'Unité de Recherche sur les Herbivores a été utilisé. Il s'agit d'un programme réalisé sous Excel qui exécute automatiquement les calculs essentiellement d'analyse de variance à partir des données obtenues lors des essais. Il renseigne directement sur l'acceptabilité de la linéarité et de la spécificité puis délivre les

coefficients de répétabilité et de reproductibilité. Les formules de ces calculs sont extraites de l'ouvrage de M. Feinberg : *La validation des méthodes d'analyse*, Masson 1996.

Equation utilisée pour déterminer la linéarité de la méthode :

$$SCE_y = SCE_l + SCE_{nl} + SCE_r$$

SCE_y somme des carrés des écarts des réponses à la réponse moyenne

SCE_l somme des carrés des écarts dus à la linéarité

SCE_{nl} somme des carrés des écarts dus à la non linéarité

SCE_r somme des carrés des écarts résiduels

Equation utilisée pour déterminer la fidélité de la méthode :

$$SCE_t = SCE_R + SCE_r$$

SCE_t somme totale des écarts à la moyenne

SCE_R somme inter dosages

SCE_r somme intra dosages

Concernant la comparaison de méthode, nous avons utilisés une procédure GLM du logiciel SAS (version sasx81, SAS Institute Inc., USA).

3. Résultats

3.1. Transposition de la méthode

n° échantillons	résultats CHU mg/l	résultats INRA kit BioMérieux à différents temps de lecture									
		2' mg/l	2' récupération/ CHU	5' mg/l	5' récupération/ CHU	7' mg/l	7' récupération/ CHU	10' mg/l	10' récupération/ CHU	12' mg/l	12' récupération/ CHU
étalon biomérieux		15		15		15.8		15		15	
contrôle CHU 1	725	873	120%	786	108%	803	111%	775	107%	771	106%
contrôle CHU 2	1290	1640	127%	1426	111%	1433	111%	1377	107%	1353	105%
Patient 1	829	1127	136%	919	111%	978	118%	926	112%	924	111%
Patient 2	212	925	436%	435	205%	279	132%	248	117%	248	117%
Patient 3	374	465	124%	435	116%	462	124%	437	117%	435	116%
Patient 4	528	584	111%	618	117%	591	112%	627	119%	627	119%
Patient 5	699	1043	149%	806	115%	884	126%	807	116%	804	115%
Patient 6	567	709	125%	641	113%	665	117%	641	113%	632	111%
Patient 7	635	774	122%	680	107%	761	120%	693	109%	697	110%
Patient 8	575	726	126%	647	113%	687	120%	654	114%	651	113%
Patient 9	395	555	141%	432	109%	497	126%	443	112%	446	113%
Patient 10	531	921	174%	638	120%	600	113%	628	118%	627	118%
moyenne			158%		121%		119%		113%		113%
écart-type			85%		26%		6%		4%		4%
CV			54%		21%		5%		4%		4%

Tableau 1 : Mise au point de la méthode de dosage sur microplaque

Les résultats obtenus (tableau 1), montrent qu'il n'y a pas d'effet du temps d'incubation au niveau des teneurs exprimées pour l'échantillon de contrôle bioMérieux. Cet échantillon est élaboré avec de la créatinine synthétique diluée dans de l'eau. Concernant les autres

échantillons, le taux de récupération par rapport au CHU démontre que le kit commercial bioMérieux surestime les teneurs de créatinine et que cet effet est très important en début d'incubation, puis diminue en fonction du temps pour se normaliser à 10 et 12 minutes d'incubation. La variabilité de ce taux suit la même évolution. La durée d'incubation agit directement sur la spécificité de la méthode et donc sur la justesse des teneurs.

3.2. Validation de la méthode

3.2.a. Résultats du test de linéarité

points de gamme mg/l	DO (5 répétitions par point de gamme)				
	y1	y2	y3	y4	y5
0	0	2	5	0	2
15	62	58	59	67	63
30	136	131	144	132	132
60	250	259	250	252	258
90	383	308	393	392	395
120	529	517	517	519	522
150	648	656	656	685	662

Tableau 2 : valeurs des 5 répétitions de chaque point de gamme

	degrés de liberté	somme des carrés	carré moyen	F calculé	F de Fischer P 0.01	conclusion
linéarité	1	1806158.7	1806158.7	37922	7.636	acceptable
non-linéarité	5	800.6215	160.1243	3.362	3.754	acceptable
résiduelle	28	133.6	47.62857			
totale	34	1807093				

Tableau 3 : test de linéarité résultat de l'analyse de variance

Les résultats (tableau 3) démontrent que la gamme étalon obtenue avec le kit bioMérieux est linéaire, c'est-à-dire qu'il existe une proportionnalité entre la réponse instrumentale et les différentes concentrations de la gamme étalon. Cette linéarité est jugée acceptable avec un niveau de confiance de 99%. La proportionnalité est exprimée au travers du modèle suivant $y = 4.38x - 1.88$, obtenue en réalisant une régression linéaire avec les résultats du tableau 2. L'analyse de variance permet d'extraire la part de variabilité induite par la non linéarité. Elle est ici très faible et son influence est acceptable, autrement dit, le modèle d'étalonnage linéaire peut-être utilisé dans les limites choisies, c'est-à-dire entre 0 et 150 mg/l.

Nous avons également déterminé les valeurs des limites de détection et quantification qui sont respectivement de 1.08 mg/l et de 4.61 mg/l

3.2.b. Résultats du test de spécificité

teneurs ajoutées mg	urine bovine : teneurs retrouvées	urine porcine : teneurs retrouvées
20	24.3	36.4
20	24.1	26.1
20	24.6	31.5
50	58.8	70.2
50	58.3	63.4
50	57.3	66.6
80	87.7	93.4
80	83.8	95.3
80	84.3	98.3
100	107.6	122.8
100	102.2	141.9
100	114.5	125.8
pente de la droite de régression	1.03	1.194
Test de signification de la pente (valeur de T)	0.945	2.952
Test de signification de l'ordonnée à l'origine (valeur de T)	2.083	1.382
Valeur critique	3.169	3.169

Tableau 4 : Test de spécificité

Les valeurs observées pour le calcul du T de Student (tableau 4), pour la signification de la pente, sont inférieures à la valeur critique pour les deux espèces, bovine et porcine. Ceci démontre que le dosage de la créatinine n'est pas influencé par les matrices urinaires bovine et porcine puisque la valeur de la pente de la droite de régression obtenue avec la méthode des ajouts dosés n'est pas significativement différente de la droite de régression théorique de valeur 1.

Concernant les deux espèces également, les valeurs du T de Student de signification de l'ordonnée à l'origine, sont inférieures à la valeur critique. Dans les deux cas l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0, autrement dit la droite de régression passe par 0, il n'y a donc pas de décalage de cette droite par rapport à la droite de régression théorique.

3.2.c. Résultats de la fidélité

dosages	Répétitions (mg/l)		
1	2207.36	2314.58	2258.42
2	2400.97	2375.61	2372.23
3	2286.01	2082.95	2230.33
4	2360.54	2353.74	2462.55
5	2326.80	2427.82	2352.45
6	2378.03	2429.56	2426.44
7	2381.75	2391.22	2154.47
8	2364.97	2369.92	2470.59

Tableau 5 : Urine bovine

dosages	Répétitions (mg/l)		
	1	214.44	207.63
2	232.41	213.81	210.43
3	221.07	221.07	216.16
4	211.66	215.06	216.76
5	214.88	213.28	214.88
6	271.69	240.46	210.79
7	236.75	224.13	232.02
8	232.70	231.05	226.10

Tableau 6 : Urine porcine

Les coefficients de variation de répétabilité et reproductibilité calculés sont pour

- l'urine bovine : CVr : 3.13%, CVR : 4.16%

- l'urine porcine : CVr : 5.42%, CVR : 6.56%

3.3. Comparaison de méthodes

matrice	échantillon	répétition	Méthode CHU		Méthode INRA	
			Moyenne (mg/l)	écart-type	Moyenne (mg/l)	écart-type
urine bovine	1	5	2421.5	17.6	2263.8	65.1
urine bovine	2	5	1667.2	19.9	1523.4	39.4
urine bovine	3	5	706.3	23.6	641.8	5.5
urine bovine	4	5	1754.7	19.2	1626.4	15.1
urine bovine	5	5	478.7	11.5	472.84	4.3
urine porcine	1	5	393.0	42.0	399.16	8.6
urine porcine	2	5	288.5	20.6	331.32	3.4
urine porcine	3	5	1815.9	47.5	1729.06	9.8
urine porcine	4	5	928.5	26.4	899	8.2
urine porcine	5	5	993.9	51.0	872.86	9.6
urine humaine	1	5	172.4	16.1	49.362	3.3
urine humaine	2	5	444.3	44.7	342.76	7.0
urine humaine	3	5	409.3	14.8	349.92	7.3
urine humaine	4	5	364.4	14.9	377.52	7.6
urine humaine	5	5	365.5	22.9	333.26	2.5

Tableau 7 : comparaison de méthodes, résultats bruts

Source de variation	Somme de carrés SCE	degrés de liberté	variances	F de Fisher	Probabilité
a: méthode	163930.655	1	163930.655	0.62	0.433
b: matrice	26793482.712	2	13396741.356	50.52	0.0001
interaction ab	24848.033	2	12424.017	0.05	0.9542

Tableau 8 : comparaison de méthode, analyse de variance

Le résultat de l'analyse de variance (**Tableau 8**), montre qu'au niveau des sources de variation l'effet méthode n'est pas significatif. Les méthodes de dosage du CHU de Clermont-Ferrand et de l'INRA ne sont pas significativement différentes. L'effet matrice est dépendant de l'espèce avec les rangs de concentration suivant : créatininurie bovine > créatininurie porcine > créatininurie humaine.

4. Conclusion

Le résultat de l'ensemble des tests démontre que la méthode de dosage INRA (miniaturisée / 96 plaques) peut-être utilisée pour le dosage de la créatinine dans l'urine bovine et l'urine porcine. Cette méthode est spécifique, linéaire, très peu variable et surtout présente un niveau de justesse acceptable par rapport à nos exigences. L'adaptation aux microplaques présente de nombreux avantages : une lecture simultanée de l'ensemble des échantillons et de la gamme, un gain de temps très important et une économie puisque la quantité de réactif mise en œuvre est réduite d'un facteur 3,3.

5. Remerciements

Les auteurs remercient A. Boissy, C. Terlouw et I Veissier (INRA de Theix) pour leurs conseils dans la réalisation de ce document et les techniciennes du laboratoire de Biochimie Médicale du CHU de Clermont-Ferrand pour leur disponibilité et leurs compétences techniques.

6. Références

- Mormède, P. (1990) Les hormones au service de l'adaptation. Collection Scientifique Stablon. 2, 47-88.
- Feinberg, M., La validation des méthodes d'analyse. Une approche chimiométrique de l'assurance qualité au laboratoire. Masson 1996.
- Norme française NF V 03-110, (1998) Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.
- Rosano, T., Ambrose, R., Wu, A., Swift, T., Yadegari, P., (1990) Candidate reference method for determining creatinine in serum: Method development and interlaboratory validation. *Clin. Chem.* 36/11, 1951-1955.
- Gennaro, M., Abrigo, C., Marengo, E., Baldin, C., Martelletti, M., (1995) Determination of creatinine in human serum. Statistical intercalibration of methods. *Analyst.* 120, 47-51.
- Okuda, T., Oie, T., Nishida, M., (1983) Liquid-chromatographic measurement of creatinine in seum and urine. *Clin. Chem.* 29/5, 851-853.
- Schneiderka, P., Pacakova, V., Stulik, K., Kloudova, M., Jelinkova, K., (1993) High-performance liquid chromatographic determination of creatinine in serum, and a correlation of the results with those of the Jaffé and enzymatic methods. *Journal of chromatography.* 614, 221-226.

