



CALCULUS ANALYSIS III

REAGENTI PRONTI ALL'USO PER LA DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA COLORIMETRICA di CALCIO, OSSALATI, AMMONIO, FOSFATI, MAGNESIO, ACIDO URICO e CISTINA in CALCOLI RENALI con METODO MANUALE



50 tests

REF 3914003

DESTINAZIONE D'USO

I calcoli renali sono costituiti da sostanze organiche od inorganiche insolubili: ossalati e/o fosfati di calcio, cistina, ac. urico, etc.

Le origini di queste condizioni possono essere: disfunzioni metaboliche, ostruzioni, infezioni, ipersaturazioni, perdite/mancanze di inibitori. La quasi totalità dei Calcoli renali è costituita da più componenti, dovuti a fenomeni di coprecipitazione o di precipitazioni successive.

PRINCIPIO

Una piccola quantità di Calcolo viene frantumata e ridotta in polvere: quindi si porta in soluzione. Su diverse aliquote simili di questa soluzione si determinano semiquantitativamente:

- il calcio, per titolazione;
- gli ossalati, l'ammonio, i fosfati, il magnesio, l'acido urico e la cistina per via colorimetrica mediante confronto visivo.

La composizione del calcolo si ricava dai valori ottenuti con il regolo allegato al kit. Per la verifica delle analisi, il kit contiene un campione di controllo.

PRECAUZIONI D'USO

- Questo prodotto è stato formulato per uso diagnostico in vitro.
- NON miscelare tra loro Reagenti da diversi lotti di produzione.
- Si raccomanda di manipolare i reagenti con cautela, evitandone l'ingestione ed il contatto con gli occhi, la pelle e le mucose; di seguire quindi le norme di buona pratica di laboratorio nell'utilizzo di questi materiali. Nelle schede di sicurezza vengono descritte le procedure operative per la manipolazione di questo prodotto. Le schede di sicurezza vengono fornite su richiesta.

ATTENZIONE!

A) Il Reagente deve essere impiegato SOLO per l'uso indicato, da personale esperto e addestrato, seguendo le norme della buona pratica di laboratorio.

B) La diagnosi clinica non può essere fatta correttamente usando il risultato di un solo test, ma deve essere fatta integrando criticamente i risultati di diversi test di laboratorio con differenti dati clinici.

C) Una serie di fattori, quali la temperatura ambientale, la temperatura dei reagenti di lavoro, possono influire sulle prestazioni del test.

D) Per la manipolazione dei Reagenti devono essere osservate le precauzioni normalmente adottate in laboratorio.

E) Seguire esattamente le operazioni/sequenze qui descritte per ottenere risultati corretti.

REAGENTI

Composizione del kit:

R1 - H₂SO₄

H₂SO₄ 95-97%

Attenzione, fortemente corrosivo, evitare il contatto con mani, bocca e occhi. H290 – H314; P280 – P262 - P390

REF 3914003
1 x 11 mL

Nota: un eventuale annerimento a livello del beccuccio gocciolatore non influisce sul risultato finale.

R2 - NaOH 1 x 13 mL

NaOH ≤25%

Pericolo. H290 – H314; P260 – P280 – P301+P330+P331 – P303+P361+P353 – P305+P351+P338 – P310 – P390

R3 - C₂₁H₁₄N₂O₄S 1 x 1,5 g

C₂₁H₁₄N₂O₄S (Calconcarboxylic acid)

R4 - EDTA 2 x 15 mL

EDTA

R5 - Borate Buffer 1 x 13 mL

Tampone Borato

R6 - FeCl₃ 1 x 8 mL

Ferro Cloruro

R7 - C₇H₆O₆S 1 x 7 mL

Acido Solfosalicilico

R8 - K₂Hgl₄ 1 x 8 mL

Sodio tetraiodomercurato

Pericolo. H290 – H301 – H312 - H331 – H341 – H373 - H412

P260 – P273 – P280 – P303+P361+P353 - P304+P340 – P305+P351+P338 – P310 - P363 – P391 – P403+P233

R9 - (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 1 x 13 mL

Ammonio molibdato

R10 - Reducing Sol. 1 x 13 mL

Metilaminofenolsolfato, sodio disolfito

Pericolo. H317 – H412

P262 – P280

R11 - BUFFER Sol. 1 x 25mL

Tampone

R12 - Dye Sol. 1 x 25 mL

Colorante Blu

R13 - Phosphomolibdic Ac. 1 x 8 mL

Acido Fosfomolibdico

R14 - NH₄OH 1 x 25 mL

NH₄OH ≤ 10%

Pericolo. H290 – H314 – H335

P260 – P280 – P301+P330+P331 – P303+P361+P353 –

P305+P351+P338 – P310 – P390

R15 - Reducing Powder 1 x 25 g

Na₂SO₃

R16 - Nitroprussiate 1 x 25 g

Sodio nitroprussiato

RSC - CONTROL 1 x 1 g

Controllo per determinazione semiquantitativa. Valori attesi su foglio allegato.

CR - Calculator Rule N°1

CS - Chromatic Scale N°1

TUBES 15 - Sample Tubes 15 mL N°5

TUBES 5 - Test Tubes 5mL N°7

TUBE 50 - Test Tube 50 mL N°1

DOS 25 - Dispenser O.25 N°2

DOS 20 - Dispenser O.20 N°2

Nota: Tutte le plastiche d'uso, da TUBES 15 a DOS 20 possono essere lavate con Acqua distillata, poste ad asciugare completamente per essere riutilizzate.

INDICAZIONI DI PERICOLO

H290 Può essere corrosivo per i metalli.



CALCULUS ANALYSIS III

H301 Tossico se ingerito.
H312 Nocivo per contatto con la pelle.
H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
H317 Può provocare una reazione allergica della pelle.
H331 Tossico se inalato.
H332 Nocivo se inalato.
H335 Può irritare le vie respiratorie.
H341 Sospettato di provocare alterazioni genetiche.
H373 Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
H412 Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

CONSIGLI DI PRUDENZA

P260 Non respirare i vapori.
P262 Evitare il contatto con gli occhi, la pelle o gli indumenti.
P273 Non disperdere nell'ambiente.
P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P301+P330+P331 In caso di ingestione: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.
P303+P361+P353 In caso di contatto con la pelle (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.
P304+P340 In caso di inalazione: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.
P305+P351+P338 In caso di contatto con gli occhi: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P310 Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
P363 Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente.
P390 Assorbire la fuoriuscita per evitare danni materiali.
P391 Raccogliere il materiale fuoriuscito.
P403+P233 Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.

STABILITÀ: i Reagenti chiusi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette, se conservati nel loro contenitore primario integro, a 15-25°C se non esposti a fonti termiche e/o variazioni di pressione. In caso di danneggiamento del contenitore primario provvedere allo smaltimento.

REAGENTI AUSILIARI PER IL CONTROLLO QUALITÀ

Usando il controllo contenuto nel kit, in cui sono presenti tutti gli analiti determinabili con questo dispositivo, è possibile verificare la reazione chimica cui fare riferimento.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO

Pronto per l'uso. Mescolare gentilmente e portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.
 Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione. L'uso non competente ci solleva da ogni responsabilità.
 Con il passare del tempo e/o per sbalzi di temperatura, il R8 ed il R13 potrebbero evidenziare una sospensione od un leggero precipitato; questo non influisce sul risultato finale dell'analisi.

STABILITÀ DOPO L'APERTURA

Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sulle etichette dalla prima apertura se conservato a 15-25°C.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Mortaio e pestello in porcellana chiara.
 Spatola. Acqua distillata.

CAMPIONI

• Calcolo renale o urinario.

SMALTIMENTO DEI MATERIALI

Per lo smaltimento dei rifiuti attenersi alle regolamentazioni locali vigenti.

PROCEDURA ANALITICA

PROCEDURA PRELIMINARE e DETERMINAZIONE DEI CARBONATI

Dopo un esame organolettico accurato (forma, colore, etc.), frantumare finemente il calcolo da esaminare in un mortaio.

Con un dosatore (cod. **DOS20**), trasferire un campione della polvere ben mescolata (un intero dosatore spianato, 15-20mg) in un Tubo campione (cod. **TUBES15**).

Impiegare il Cod. **RSC** – **CONTROL** del kit nello stesso modo.

Aggiungere 5 gocce di **R1 - H2SO4** e avvitare il tappo. Agitare gentilmente tenendolo ritto, o battendolo sul fondo con le dita per miscelare; non rovesciare per non perdere materiale. Mettere in un portaprovette fino a completa dissoluzione.

Lo sviluppo di effervescenza durante la dissoluzione e/o l'agitazione, indica la presenza di carbonati.

Versare circa 40 mL di Acqua distillata nel **TUBE50**. Svitare il tappo del **TUBES15** contenente il campione disciolto e versarvi circa 10-15mL di Acqua dal **TUBE50**; tappare e miscelare 2-3 volte per inversione. Quindi riunire il contenuto nel **TUBE50**. Ripetere un'ulteriore volta la procedura per avere la certezza di aver portato tutto il campione disciolto nel **TUBE50**.

Portare quindi a 50mL con Acqua distillata ed avvitare il tappo; miscelare per inversione 2-3 volte.

Distribuire il contenuto del **TUBE50** nei 7 **TUBES5** disponibili, a livello di 5mL per 6 tubi (tacca dei 5mL) e mettendo solo 1mL esatto nel 7° tubo (per il Magnesio). Che poi verrà portato alla tacca dei 5mL con Acqua distillata.

DETERMINAZIONE DEL CALCIO

Principio

Il calcio viene determinato complessometricamente con EDTA, con l'acido calconcarbossilico come indicatore.

Procedura

Aggiungere ad un tubo con campione alla tacca da 5mL

- **R2** 2 gocce ed

- **R3** 1 intero dosatore spianato di polvere con **DOS20**. Agitare bene; quindi, sempre agitando gentilmente, aggiungere

- **R4** goccia a goccia, finché la colorazione della soluzione non vira dal rosso al blu. Contare esattamente il numero di gocce aggiunte. La percentuale in Calcio del calcolo si ha moltiplicando il numero delle gocce X5.

DETERMINAZIONE DEGLI OSSALATI

Principio

Gli ossalati decolorano il complesso colorato formato da acido solfosalicilico e da Fe(III).

Procedura

Aggiungere ad un tubo con campione alla tacca da 5mL, tappando ed agitando gentilmente in successione

- **R5** 2 gocce,



CALCULUS ANALYSIS III

- **R6** 3 gocce e
- **R7** 3 gocce; tappare e lasciare riposare per 2 minuti.

Classificare confrontando il colore della soluzione nel tubo di reazione con la relativa scala colorimetrica (**CS**). Guardare sempre attraverso la soluzione dall'alto in basso e leggere la percentuale in ossalati del calcolo. Valutare anche le gradazioni intermedie.

DETERMINAZIONE DELL'AMMONIO

Principio

Il Sodio tetraiodomercurato e lo ione ammonio formano soluzioni colorate dal giallo al bruno.

Procedura

Aggiungere ad un tubo con campione alla tacca da 5mL, tappando ed agitando gentilmente in successione

- **R8** 3 gocce,
- **R2** 3 gocce.

Classificare confrontando il colore della soluzione nel tubo di reazione con la relativa scala colorimetrica (**CS**). Guardare sempre attraverso la

soluzione dall'alto in basso e leggere la percentuale in ammonio del calcolo. Valutare anche le gradazioni intermedie.

DETERMINAZIONE DEI FOSFATI

Principio

L'acido fosfomolibdico formatosi per aggiunta del molibdato d'ammonio viene ridotto con un adatto riducente a blu di molibdeno.

Procedura

Aggiungere ad un tubo con campione alla tacca da 5mL tappando ed agitando gentilmente in successione

- **R9** 5 gocce,
- **R10** 5 gocce, lasciando riposare quindi per 5 minuti.

Classificare confrontando il colore della soluzione nel tubo di reazione con la relativa scala colorimetrica (**CS**). Guardare sempre attraverso la soluzione dall'alto in basso e leggere la percentuale in fosfati del calcolo. Valutare anche le gradazioni intermedie.

DETERMINAZIONE DEL MAGNESIO

Principio

In soluzione tamponata il magnesio reagisce con 1-azo-2-idrossi-3-(2,4-dimetilcarbossilidolo)-naftalen-1'-(2-idrossibenzen-5-solfonato sodico), formando un complesso rosso.

Procedura

Nel **TUBES5** contenente 1 mL di campione, portare alla tacca da 5 mL con acqua distillata. Tappare e miscelare. Aggiungere tappando ed agitando gentilmente in successione

- **R11** 10 gocce,
- **R12** 10 gocce. Attendere 1 minuto.

Classificare confrontando il colore della soluzione nel tubo di reazione con la relativa scala colorimetrica (**CS**). Guardare sempre attraverso la soluzione dall'alto in basso e leggere la percentuale in magnesio del calcolo. Valutare anche le gradazioni intermedie.

DETERMINAZIONE DELL'ACIDO URICO

Principio

In soluzione tamponata l'acido urico riduce l'acido fosfomolibdico a blu di molibdeno.

Procedura

Aggiungere ad un tubo con campione alla tacca da 5mL tappando ed agitando gentilmente in successione

- **R13** 3 gocce, lasciando riposare per 2 minuti.

Aggiungere quindi

- **R5** 2 gocce ed agitare.

Classificare immediatamente confrontando il colore della soluzione nel tubo di reazione con la relativa scala colorimetrica (**CS**). Guardare sempre attraverso la soluzione dall'alto in basso e leggere la percentuale in acido urico del calcolo. Valutare anche le gradazioni intermedie.

Questo confronto deve avvenire entro 10" dall'aggiunta del reattivo R5, poiché la colorazione non è stabile e tende a virare al blu.

DETERMINAZIONE DELLA CISTINA

Principio

Il solfito di sodio riduce la cistina a cisteina, che in soluzione alcalina con il sodio nitroprussiato forma una colorazione rossa .

Procedura

Aggiungere ad un tubo con campione alla tacca da 5mL agitando in successione

- **R14** 10 gocce,
- **R15** 1 cucchiaino raso con **DOS 25**, agitando fino a completa

dissoluzione.

Dopo 1' aggiungere quindi

- **R16** 1 cucchiaino raso con l'altro **DOS 25**, agitando fino a completa dissoluzione.

Dopo 30" classificare confrontando il colore della soluzione nel tubo di reazione con la relativa scala colorimetrica (**CS**). Guardare sempre attraverso la soluzione dall'alto in basso e leggere la percentuale in cistina del calcolo. Valutare anche le gradazioni intermedie.

NOTA

È possibile ridurre i tempi d'analisi, eseguendo la determinazione dell'ammonio nei 2' di attesa necessari alla determinazione dell'ossalato, e quella del magnesio durante i 5' di attesa necessari per la determinazione dei fosfati.

CALCOLO

Gli elementi chimici determinati con questo kit formano in genere nei calcoli renali i seguenti composti, postulati come base del regolo (**CR**):

$\text{CaC}_2\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Whewellite	Calcio ossalato
$\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Struvite	Magnesio ammonio fosfato
$\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Brushite	Calcio fosfato secondario
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Apatite	Calcio fosfato terziario basico
Ammonio urato		
Acido urico		
Cistina		

La Weddellite ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) e la Carbonato apatite ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6\text{CO}_3$) sono stati trascurati, poiché una tale differenziazione non ha significato dal punto di vista clinico.

Dalle percentuali determinate dei singoli componenti si risale alla composizione del calcolo renale come segue:

- per ogni catione si ipotizzano, in base agli anioni effettivamente presenti, i possibili composti dell'elenco sopra citato;
- con il regolo calcolatore (**CR**) si ricavano poi le quantità dei singoli composti probabilmente presenti.

1) Ossalato di Calcio (Whewellite):

1.1 impostare sulla scala degli ossalati la percentuale di ossalato determinata sperimentalmente e leggere sulla scala dell'ossalato di



CALCULUS ANALYSIS III

calcio il valore corrispondente;

1.2 risalire alla quantità di calcio corrispondente;

1.3 se la quantità di calcio determinata sperimentalmente è maggiore alla quantità calcolata come sopra descritto, ricavare per sottrazione la quantità di calcio non combinata come ossalato (cfr Fosfati di Calcio).

2) Fosfato ammonico di magnesio (Struvite):

2.1 impostare sulla scala del magnesio la percentuale di magnesio determinata sperimentalmente e leggere sulla scala della struvite il valore corrispondente di fosfato ammonico di magnesio;

2.2 risalire alle quantità di ammonio e fosfato corrispondenti;

2.3 se la quantità di ammonio o di fosfato determinata sperimentalmente è maggiore della quantità calcolata come sopra descritto, ricavare per sottrazione la quantità di ammonio e di fosfato non combinati come fosfato ammonico di magnesio (cfr urato di ammonio per ammonio, fosfati di calcio per fosfato).

3) Urato di Ammonio

3.1 impostare sulla scala dell'ammonio la percentuale di ammonio determinata sperimentalmente, oppure quella ottenuta per sottrazione

(vedi punto 2.2) e leggere sulla scala dell' urato di ammonio il valore corrispondente;

3.2 risalire alla corrispondente quantità di acido urico della relativa scala;

3.3 se la quantità di acido urico determinata sperimentalmente è maggiore della quantità calcolata come sopra descritto, ricavare per sottrazione la quantità residua in acido urico.

4) Fosfati di Calcio

4.1 impostare sulla scala del calcio la percentuale di calcio determinata sperimentalmente, oppure quella ottenuta per sottrazione (vedi punto 1.2);

4.2 controllare contemporaneamente sulla scala dei fosfati quali dei valori ricavati per calcolo corrispondono meglio con quello determinato sperimentalmente o con quello ricavato per sottrazione, come descritto al punto 2.2;

4.3 ricavare infine dalle rispettive scale la concentrazione in brushite.

Esempio

Dall'analisi di un calcolo otteniamo le seguenti concentrazioni:

calcio 35%, ossalati 15%, fosfati 40%

Il calcolo può quindi contenere ossalato di calcio e fosfati di calcio.

Il 15% di ossalato corrisponde sul regolo al 25% di ossalato di calcio.

Il 25% di ossalato di calcio corrisponde al 7% di calcio.

Non combinato come ossalato rimane quindi il 28% di calcio.

Sul regolo il 28% di calcio corrisponde al 40% di fosfati: dalla scala inferiore del regolo si deduce quindi il 70% di apatite.

Si conclude quindi che il calcolo è costituito dal 28% di calcio ossalato e dal 70% di apatite.

Nota: per ragioni di metodo, generalmente la somma dei componenti non dà un valore esattamente uguale al 100%.

CONFRONTO TRA METODI

Il confronto dei risultati ottenuti con **CALCULUS ANALYSIS 3** e con un reagente simile disponibile in commercio ha dato risultati pressoché identici.

BIBLIOGRAFIA

1. Shokouhi E. et al., Res.J.Biol.Sci. 3, 620 (2008).
2. Iqbal M.W. et al., CJPAS 2, 139 (2008).
3. Lopez M. et al., Pediatr. Nephrol. 25, 49 (2010).
4. Pandeya A. et al., Nepal Med. Coll. J. 12, 190 (2010).
5. Sandhya A. et al., IJABPT 1, 175 (2010).
6. Raina A.F. et al., Int.J.Adv.Med. 4, 1477 (2017).
7. Cho S.T. et al., Int. J. Urology 20, 208 (2013).

Codice Ramo CND W010199