



ISTRUZIONI PER L'USO

CALCULUS ANALYSIS III

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

1 – INTRODUZIONE E DESTINAZIONE D'USO

Per solo uso diagnostico *in Vitro*

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.

Il kit contiene tutti i reattivi per la determinazione semiquantitativa colorimetrica di Carbonati, Calcio, Ossalati, Ammonio, Fosfati, Magnesio, Acido urico e Cistina nei calcoli renali con metodo manuale.

2 – PRINCIPIO DEL METODO

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.

3 – MATERIALI FORNITI – CONFEZIONAMENTO

Prodotto	Tipologia	REF	Confezione
CALCULUS ANALYSIS III	Chimico-colorimetrico	3914003 (50 test)	Diversi reagenti contenuti in appositi contenitori. Si veda di seguito la composizione dei reattivi. Imballo secondario: scatola di cartone.

R1 – H₂SO₄

1 x 11 mL



Acido solforico <100%

PERICOLO.

H314; P260-P264-P280-P301+P330+P331-P303+P361+P353 – P304 + P340- P305+P351+P338-P310-P321-P363-P405-P501

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

R2- NaOH

1 x 13 mL



Idrossido di sodio ≤ 30%

PERICOLO.

H314; P260-P264-P280-P301+P330+P331-P303+P361+P353 – P304 + P340- P305+P351+P338-P310-P321-P363-P405-P501

R3- Ac. Calconcarbossilico in alcol H225

1 x 17 mL



Ac. Calconcarbossilico in alcol H225

ATTENZIONE.

H319; P280-P337+P313

R4- EDTA

2 x 15 mL

EDTA

R5 – Tampone Borato

1 x 13 mL



Idrossido di sodio ≤2%,

Tetraborato di sodio decaidrato <5%

PERICOLO.

H315-H319-H360FD; P201-P202-P264-P280-P302+P352-P305+P351+P338-P308+P313-P321-P332+P313-P337+P313-P362+P363-P405-P501

R6 – FeCl₃

1 x 8 mL



Ferro Cloruro

ATTENZIONE.

H290; P390

R7 – C₇H₆O₆S

1 x 7 mL



Acido solfosalicilico

ATTENZIONE.

H315-H319; P280-P337+P313

R8 – K₂HgI₄

1 x 8 mL



Potassio

Tetraiodomercurato 100%





PERICOLO.

H301-H314-H341-H373-H410; P201-P202-P260-P264-P270-P273-P280-P301+P310-P301+P330+P331-P303+P361+P353-P304+P340-P305+P351+P338

R9 – (NH4)6Mo7O24 1 x 13 mL

Ammonio molibdato

ATTENZIONE.

H315-H319; P280-P337+P313



R10 – Sol. Riducente 1 x 13 mL

Metilaminofenolsolfato<1%, sodio disolfito

ATTENZIONE

H319 – H412; P264-P273-P280-P305+P351+P338-P337+P313-P501



R11 – Sol.Tampone 1 x 25 mL

Tampone

Acido boricco<3%, sodio idrossido<1%

PERICOLO.

H315-H319-H360FD;P201-P202-P264-P280-P302+P352-P305+P351+P338-P308+P313-P362+P364-P405-P501



R12- Sol. Colorante 1 x 25 mL

Colorante Blu

ATTENZIONE.

H319; P280-P337+P313



R13 – Acido Fosfomolibdico 1 x 8 mL

Ac. Fosfomolibdico<20%

PERICOLO.

H314;P260-P264-P280-P301+P330+P331-P303+P351+P338-P310-P321-P363-P405-P501



R14- NH4OH 1 x 25 mL

Idrossido di ammonio<50%

PERICOLO.

H314–H335-H410;P260-P261-P264-P271-P273-P280-P301+P330+P331–P303+P361+P353–P304+P340-P305+P351+P338–P310–P312-P321-P363-P391-P403+P233-P405-P501



R15 – Polvere riducente 1 x 25 g

Na2SO3

R16- Nitroprussiato 1 x 25 g

Sodio nitroprussiato

RSC- CONTROL 1 x 1 g

CONTROLLO per deter. semiquantitativa. Valori attesi su foglio allegato.

ATTENZIONE.

H319; P280-P337+P313



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 0.25 N°2

DOS 20 – Dispenser 0.20 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.

H301 Tossico se ingerito.

H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

H315 Provoca irritazione cutanea.

H319 Provoca grave irritazione oculare.

H335 Può irritare le vie respiratorie.

H360FD Può nuocere alla fertilità. Può nuocere al feto

H341 Sospettato di provocare alterazioni genetiche.





- H373** Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
H410 Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
H412 Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

CONSIGLI DI PRUDENZA

- P201** Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P202 Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
P260 Non respirare i vapori.
P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P264 Lavare accuratamente ...dopo l'uso
P270 Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso
P271 Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato.
P273 Non disperdere nell'ambiente.
P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P301+P310 IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico/...
P301+P330+P331 In caso di ingestione: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito.
P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua/...
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.
P308+P313 IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P310 Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
P312 Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico/.../in caso di malessere.
P314 In caso di malessere, consultare un medico.
P321 Trattamento specifico (vedere ... su questa etichetta)
P330 Sciacquare la bocca.
P332+P313 In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
P362+P364 Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.
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.
P405 Conservare sotto chiave.
Smaltimento
P501 Smaltire il prodotto/recipiente in...

4 – MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

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

5 – PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- 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, evitando 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.
- Non utilizzare dopo la data di scadenza. La qualità dei reagenti non può essere garantita oltre la data di scadenza o se il kit è conservato in condizioni non appropriate.

ATTENZIONE!

- Il Reagente deve essere impiegato SOLO per l'uso indicato, da personale esperto e addestrato, seguendo le norme della buona pratica di laboratorio.
- 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.
- Una serie di fattori, quali la temperatura ambientale, la temperatura dei reagenti di lavoro, possono influire sulle prestazioni del test.
- Per la manipolazione dei Reagenti devono essere osservate le precauzioni normalmente adottate in laboratorio.
- Seguire esattamente le operazioni/sequenze qui descritte per ottenere risultati corretti.
- Il Certificato di Analisi e la Scheda Dati di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito web: www.masciabrunelli.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.
- Comunicare a Mascia Brunelli Spa e alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo diagnostico in vitro. complaint@masciabrunelli.it

6 – CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA

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.

STABILITÀ DOPO L'APERTURA: Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sulle etichette se conservato a 15-25°C.

7 – 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 e l'ambito delle concentrazioni attese a cui fare riferimento.

8 – PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO

Pronti 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.

9 – CAMPIONI

Calcolo renale o urinario.

10 – SMALTIMENTO DEI MATERIALI

Per lo smaltimento dei rifiuti attenersi alle regolamentazioni locali vigenti.

11 – 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 TUBE55 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 3 gocce (4 se si desidera un colore più intenso) quindi 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,
- 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-dimetilcarbossilidido)-naftalen-1'-(2-idrossibenzen-5-solfonato sodico), formando un complesso rosso.

Procedura

Nel TUBE55 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.

12 – 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 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%.

13 – CONFRONTO TRA METODI

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

14 – 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)

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti di temperatura		Codice del lotto (XXX)		Fabbricante		Mantenere asciutto		Identificatore dispositivo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Utilizzare entro (anno/mese)		Numero di catalogo		Non riutilizzare		Fragile, maneggiare con cura		Tenere lontano dal calore

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'uso (IFU) - Revisione 2	Aggiornamento del contenuto, del layout e dei simboli per la SDS	2024/03

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.





INSTRUCTION FOR USE

CALCULUS ANALYSIS III

READY TO USE REAGENTS FOR SEMIQUANTITATIVE COLORIMETRIC DETERMINATION OF CARBONATE, CALCIUM, OXALATE, AMMONIUM, PHOSPHATE, MAGNESIUM, URIC ACID AND CYSTINE ON KIDNEY STONES BY MANUAL METHOD

1 – INTRODUCTION AND INTENDED USE

Per solo uso diagnostico *in Vitro*

Kidney stones are composed of insoluble organic or inorganic substances: calcium oxalates and/or phosphates, cystine, uric ac., etc.

The origins of these conditions can be: metabolic dysfunction, obstructions, infections, hypersaturation, loss/lack of inhibitors. Almost all of the renal calculations are made up of several components, due to co-precipitation or subsequent precipitations.

The kit include all the reagents for semiquantitative colorimetric determination of Carbonate, Calcium, Oxalate, Ammonium, Phosphate, Magnesium, Uric acid and Cystine on kidney stones by manual method.

2 - PRINCIPLE OF THE METHOD

A small amount of calculus is crushed and reduced to powder, and then brought into solution. On different similar rates of this solution, they are determined semi-quantitatively:

calcium, by titration;

oxalates, ammonium, phosphates, magnesium, uric acid and cystine by colorimetric comparison.

The calculus composition is derived from the values obtained with the ruler attached to the kit. The kit contains a control sample for testing purposes.

3 - MATERIALS PROVIDED – PACKAGING

Product	Type	REF	Pack
CALCULUS ANALYSIS III	Chemical- colorimetric	3914003 (50 tests)	Various reagents contained in appropriate containers. See below for the composition of the reagents. Secondary packaging: cardboard box.

R1 – H₂SO₄

1 x 11 mL



Sulphuric Acid <100%

DANGER.

H314; P260-P264-P280-P301+P330+P331-P303+P361+P353 – P304 + P340- P305+P351+P338-P310-P321-P363-P405-P501

Note: a possible blackening to the dropping funnel doesn't influence the final result.

R2- NaOH

1 x 13 mL



Sodium hydroxide ≤ 30%

DANGER.

H314; P260-P264-P280-P301+P330+P331-P303+P361+P353 – P304 + P340- P305+P351+P338-P310-P321-P363-P405-P501

R3- Ac. Calconcarboxylic in alcohol H225

1 x 17 mL



Ac. Calconcarboxylic in alcohol H225

WARNING.

H319; P280-P337+P313

R4- EDTA

2 x 15 mL

EDTA

R5 – Borate Buffer

1 x 13 mL



Sodium hydroxide ≤2%,

Sodium Tetraborate decahydrate <5%

DANGER.

H315-H319-H360FD; P201-P202-P264-P280-P302+P352-P305+P351+P338-P308+P313-P321-P332+P313-P337+P313-P362+P363-P405-P501

R6 – FeCl₃

1 x 8 mL



Iron chloride

WARNING.

H290; P390

R7 – C₇H₆O₆S

1 x 7 mL



Sulphosalicylic Acid

WARNING.

H315-H319; P280-P337+P313





R8 – K2HgI4

Potassium Tetraiodomercurate 100%

1 x 8 mL



DANGER.

H301-H314-H341-H373-H410; P201-P202-P260-P264-P270-P273-P280-P301+P310-P301+P330+P331-P303+P361+P353-P304+P340-P305+P351+P338

R9 – (NH4)6Mo7O24

Ammonium molybdate

1 x 13 mL



WARNING.

H315-H319; P280-P337+P313

R10 – Reducing Sol.

Methylaminophenolsulphate <1%, sodium disulphite

1 x 13 mL



WARNING

H319 – H412; P264-P273-P280-P305+P351+P338-P337+P313-P501

R11 – Buffer Sol.

Buffer
Boric acid <3%, sodium hydroxide <1%

1 x 25 mL



DANGER.

H315-H319-H360FD;P201-P202-P264-P280-P302+P352-P305+P351+P338-P308+P313-P362+P364-P405-P501

R12 – Dye Sol.

Blue dyeing agent

1 x 25 mL



WARNING.

H319; P280-P337+P313

R13 – Phosphomolibdic

Phosphomolibdic <20%

1 x 8 mL



DANGER.

H314;P260-P264-P280-P301+P330+P331-P303+P351+P338-P310-P321-P363-P405-P501

R14- NH4OH

Ammonium hydroxide <50%

1 x 25 mL



DANGER.

H314–H335-H410;P260-P261-P264-P271-P273-P280-P301+P330+P331–P303+P361+P353–P304+P340-P305+P351+P338–P310–P312-P321-P363-P391-P403+P233-P405-P501

R15 – Reducing Powder

Na2SO3

1 x 25 g

R16- Nitroprussiate

Sodium nitroprussiate

1 x 25 g

RSC- CONTROL

CONTROL for semiquantitative determination. Expected values on attached sheet.

1 x 1 g



WARNING.

H319; P280-P337+P313

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

Note: All the plastics used, from TUBES 15 to DOS 20 can be washed with distilled water, placed to dry completely to be reused.

HAZARD STATEMENTS

H290 May be corrosive to metals.

H301 Toxic if swallowed.





- H314** Causes severe skin burns and eye damage.
H315 Causes skin irritation.
H319 Causes serious eye irritation.
H335 May cause respiratory irritation.
H360FD May damage fertility. May damage the unborn child.
H341 Suspected of causing genetic defects.
H373 May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure.
H410 Very toxic to aquatic life with long lasting effects.
H412 Harmful to aquatic life with long lasting effects.

PRECAUTIONERY STATEMENTS

- P201** Obtain special instructions before use.
P202 Do not handle until all safety precautions have been read and understood.
P260 Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/ spray.
P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/ spray.
P264 Wash ... thoroughly after handling.
P270 Do not eat, drink or smoke when using this product.
P271 Use only outdoors or in a well-ventilated area.
P273 Avoid release to the environment.
P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/ face protection.
P301+P310 IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER/doctor/...
P301+P330+P331 IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water/...
P303+P361+P353 If on skin (or hair): remove/take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower.
P304+P340 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.
P305+P351+P338 If in eyes: rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P308+P313
P310 Immediately call a poison center or doctor/physician.
P312 Call a POISON CENTER/doctor/.../if you feel unwell.
P314 Get medical advice/attention if you feel unwell.
P321 Specific treatment (see ... on this label).
P330 Rinse mouth.
P332+P313 If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
P337+P313 If eye irritation persists: Get medical advice/ attention.
P362+P364 Take off contaminated clothing and wash it before reuse.
P363 Wash contaminated clothing before reuse.
P390 Absorb spillage to prevent material damage.
P391 Collect spillage.
P403+P233 Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed.
P405 Store locked up.
P501 Dispose of contents/container to ...

4 - MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Clean porcelain pestle and mortar. Spatula. Distilled water.

5 - PRECAUTIONS AND WARNINGS

- This product has been formulated for in vitro diagnostic use.
- DO NOT mix Reagents from different Production lots.
- It is recommended to handle the reagents carefully, avoiding ingestion and contact with eyes, mucous membranes and skin; to use reagents according to good laboratory practice. On the material safety data sheet are detailed the operating procedures for the manipulation of this product. Material safety data sheet should be supplied on request.
- Do not use after expiry date. The reagents' quality cannot be guaranteed beyond their shelf-life date or if the reagents are stored under inappropriate conditions.

ATTENTION!

- The reagent must be used ONLY for the intended destinations, by expert and trained people and in according to good laboratory practice.
- The clinical diagnosis cannot be done correctly using the result of only one test, but have to be done integrating critically the results of different laboratory tests and clinical data.
- A lot of factors, as room temperature, the working reagent temperature, may affect the tests performances.
- All the precautions normally used in the laboratory must be respected for reagents handling.
- Follow exactly what described here to have right results.
- The Certificates of Analysis and the Safety Data Sheet of the product are available on the website. www.masciabrunelli.it.
- The information provided in this document has been defined to the best of our knowledge and ability and represents a guideline for the proper use of the product but without obligation or liability. In all cases existing local laws, regulations and standard procedures must be observed for the examination of samples collected from human and animal organic districts, for environmental samples and for products intended for human or animal consumption. Our information does not relieve our customers from their responsibility for checking the suitability of our product for the intended purpose.
- Notify Mascia Brunelli Spa and the Relevant Authorities of any serious incidents occurring in connection with the in vitro diagnostic device. complaint@masciabrunelli.it

6 - STORAGE CONDITIONS AND SHELF LIFE

The Reagents are stable up to the expiry date mentioned on the labels, stored at 15-25°C, if closed and kept in their intact primary container; if not exposed to heat sources and/or pressure variations.

In case of damaging of the primary container organize the waste disposal.





STABILITY AFTER FIRST OPENING: The product is stable up to the expiry date mentioned on the labels after the first open if stored at 15-25°C.

7 – QUALITY CONTROL

Using the control in the kit, as it contains all analytes that can be determined with this device; you can verify the chemical reaction for your reference.

8 – PREPARATION OF THE WORKING REAGENT

Ready-to-use. Mix kindly before use and let the reagent reach the working temperature before use. Close immediately after handling. The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination.

During the time and/or due to temperature changes, the R8 and R13 may form a suspension or a precipitate; this does not affect the final result of the analysis.

9 – SAMPLES

Renal or urinary stone.

10 – WASTE DISPOSAL

Observe all federal, state and local environmental regulations for waste disposal.

11 – ANALYTICAL PROCEDURE

PRELIMINARY PHASE AND TEST FOR CARBONATE

After an accurate organoleptic examination (form, colour, etc.), crush the kidney stone and reduce to powder in a mortar. With a dosing spoon (ref. DOS20), transfer a sample of the well mixed powder (a level scoop, 15-20mg) in a Sample tube (ref. TUBES15).

Use the ref. RSC – CONTROL as a sample.

Add 5 drops of R1 - H₂SO₄ and close the cap. Shake gently by holding it upright or tapping it on the bottom with your fingers to mix; do not tip it upside down to avoid losing material. Place in a tube holder until completely dissolved. **The formation of effervescence during dissolution and/or agitation, indicates the presence of carbonates.**

Add about 40 mL of distilled water in the TUBE 50. Unscrew the cap of TUBES 15 with the dissolved sample and adding about 10-15mL of distilled water from TUBE 50; close and mix 2-3 times by inversion. Then mix the contents into the TUBE 50. Repeat the procedure once again to make sure that you have brought all the dissolved sample into the TUBE 50.

Then make up to 50mL with distilled water and screw in the cap; mix for inversion 2-3 times.

Distribute the contents of the TUBE 50 in the 7 available TUBES 5, at a level of 5mL for 6 tubes (5mL mark) and placing only 1mL exactly in the 7th tube (for Magnesium). That will then be taken to the 5mL mark with distilled water.

CALCIUM DETERMINATION

Principle

Calcium is determined in a complexometric way with EDTA, with calconcarboxylic acid as an indicator.

Procedure

Add to a tube with sample to the 5 mL mark

- R2 2 drops and

- R3 3 drops (4 if you want a more intense colour) then add

- R4 drop by drop, until the colour of the solution changes from red to blue. Count exactly the number of drops added.

The Calcium percentage in Calcium is obtained by multiplying the number of drops x 5.

OXALATE DETERMINATION

Principle

Oxalates discolorize the coloured complex formed by sulphosalicylic acid and Fe (III).

Procedure

Add to a tube with sample to the 5 mL mark, closing and shaking gently in succession

- R5 2 drops,

- R6 3 drops and

- R7 3 drops; close and leave to stand for 2 minutes.

Classify by comparing the colour of the solution in the reaction tube with its colorimetric scale (CS). Always look through the solution from top to bottom and read the percentage of oxalate in the calculation. Assess intermediate grades as well.

AMMONIUM DETERMINATION

Principle

Sodium tetraiodomercurate and ammonium ion form yellow to brown coloured solutions.

Procedure

Add to a tube with sample to the 5 mL mark, closing and shaking gently in succession

- R8 3 drops,

- R2 3 drops.

Classify by comparing the colour of the solution in the reaction tube with its colorimetric scale (CS). Always look through the solution from top to bottom and read the percentage of ammonium in the calculation. Assess intermediate grades as well.

PHOSPHATES DETERMINATION

Principle

The phosphomolybdic acid formed by the addition of ammonium molybdate is reduced with a suitable reducing agent to molybdenum blue.

Procedure

Add to a tube with sample to the 5 mL mark, closing and shaking gently in succession

- R9 5 drops,

- R10 5 drops, then leave to rest for 5 minutes.

Classify by comparing the colour of the solution in the reaction tube with its colorimetric scale (CS). Always look through the solution from top to bottom and read the percentage of phosphates in the calculation. Assess intermediate grades as well.





MAGNESIUM DETERMINATION

Principle

In buffered solution magnesium reacts with 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylcarboxanilide)-naphthalene-1'-(2-hydroxybenzene-5-sulfonate sodium), forming a red complex.

Procedure

In the **TUBESS** containing 1 mL of sample, make up to the 5 mL mark with distilled water, tap and mix. Add closing and shaking gently in succession

- **R11** 10 drops,
- **R12** 10 drops. Wait 1 minute.

Classify by comparing the colour of the solution in the reaction tube with its colorimetric scale (**CS**). Always look through the solution from top to bottom and read the percentage of magnesium in the calculation. Assess intermediate grades as well.

URIC ACID DETERMINATION

Principle

In buffered solution, uric acid reduces phosphomolybdenic acid to molybdenum blue.

Procedure

Add to a tube with sample to the 5 mL mark

- **R13** 3 drops, waiting 2 minutes.

Then add

- **R5** 2 drops and mixing.

Classify immediately by comparing the colour of the solution in the reaction tube with its colorimetric scale (**CS**). Always look through the solution from top to bottom and read the percentage of uric acid in the calculation. Assess intermediate grades as well.

This comparison must be made within 10" of the addition of the R5 reagent, as the staining is not stable and tends to turn blue.

CYSTINE DETERMINATION

Principle

Sodium sulfite reduces cystine to cysteine, which in alkaline solution with sodium nitroprussiate forms a red colouring.

Procedure

Add to a tube with sample to the 5 mL mark, closing and shaking gently in succession

- **R14** 10 drops,
- **R15** 1 spoonful with **DOS 25** well levelled of powder, stirring until completely dissolved.

After 1' add

- **R16** 1 spoonful with **DOS 25** well levelled of powder, stirring until completely dissolved.

After 30" classify by comparing the colour of the solution in the reaction tube with its colorimetric scale (**CS**). Always look through the solution from top to bottom and read the percentage of cystine in the calculation. Assess intermediate grades as well.

NOTE

It is possible to reduce the time of analysis by performing the determination of ammonium in the 2' waiting time necessary for the determination of oxalate and magnesium during the 5' waiting time necessary for the determination of phosphates.

12 – CALCULATION

The chemical elements determined with this kit generally form the following compounds in kidney stones, postulated as the basis of the calculator rule (**CR**):

$\text{CaC}_2\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Whewellite	Calcium oxalate
$\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Struvite	Magnesium ammonium phosphate
$\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Brushite	Dicalcium phosphate
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Apatite	Tricalcium phosphate
Ammonium urate		
Uric acid		
Cystine		

Weddellite ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) and Apatite carbonate ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6\text{CO}_3$) have been overlooked because such differentiation has no clinical significance.

From the determined percentages of the single components we refer to the composition of the kidney stone as follows:

- for each cation, the possible compounds of the above mentioned list are hypothesized, based on the anions really present;
- Using the calculator rule (**CR**) you can then obtain the quantities of the single compounds probably present.

1) Calcium Oxalate (Whewellite):

- 1.1 set on the scale of oxalates the percentage of oxalate determined experimentally and read the corresponding value on the scale of the calcium oxalate;
- 1.2 trace the corresponding amount of calcium;
- 1.3 if the amount of calcium determined experimentally is greater than the quantity calculated as described above, subtract the amount of non-combined calcium as oxalate (see Calcium Phosphate).

2) Magnesium ammonium phosphate (Struvite):

- 2.1 set on the scale of magnesium the percentage of magnesium determined experimentally and read the corresponding value on the scale of the Struvite corresponding to magnesium ammonium phosphate;
- 2.2 trace the corresponding quantities of ammonium and phosphate;
- 2.3 if the amount of ammonium or phosphate determined experimentally is greater than the quantity calculated as described above, subtract the amount of ammonium and noncombined phosphate as magnesium ammonium phosphate (see ammonium urate for ammonium, calcium phosphates for phosphate).

3) Ammonium Urate

- 3.1 set on the scale of ammonium the percentage of ammonium determined experimentally, or obtained by subtraction (see point 2.2) and read the corresponding value on the ammonium urate scale;
- 3.2 trace the corresponding amount of uric acid;
- 3.3 if the amount of experimentally determined uric acid is greater than the amount calculated as described above, subtract the residual amount of uric acid.





4) Calcium phosphate

- 4.1 set on the scale of calcium the percentage of calcium determined experimentally, or that obtained by subtraction (see point 1.2);
- 4.2 check on the scale of phosphates which are the values obtained by calculation who correspond better to the values determined experimentally or subtracted, as described in point 2.2;
- 4.3 Finally, trace the brushite concentration from the respective scales.

Example

From stone analysis we obtained the following concentrations:

calcium 35%, oxalate 15%, phosphate 40%
 Kidney stone may therefore contain calcium oxalate and calcium phosphates.
 15% of oxalate correspond to 25% of calcium oxalate on calculator rule (CR).
 25% of calcium oxalate correspond to 7% of calcium.

Not combined as oxalate therefore remains 28% calcium.
 28% calcium corresponds to 40% phosphates on calculator rule (CR): 70% apatite is thus deducted from the lower scale of calculator rule (CR).

It is concluded that the stone consists of 28% calcium oxalate and 70% apatite

Note: For method reasons, the sum of components does not generally give a value exactly equal to 100%.

13 – COMPARISON OF METHODS

The comparison of the results obtained with CALCULUS ANALYSIS III and a similar reagent available on the market has given almost identical results.

14 – BIBLIOGRAPHY

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)

TABLE OF APPLICABLE SYMBOLS

	In Vitro Diagnostic Medical Device		Temperature limitation		Batch code (XXX)		Manufacturer		Keep dry		Unique device identifier
	Consult Instructions for use		Use by (year/month)		Catalogue number		Do not reuse		Fragile, handle with care		Keep away from heat

REVISION HISTORY

Version	Description of changes	Date
Instructions for Use (IFU) - Revision 2	Updated layout, content and Symbols in the SDS	2024/03

Note: minor typographical, grammatical, and formatting changes are not included in the revision history.

