

Best. Nr. CA 015
Inhalt: 1 x 100 mL Farbreagenz
 1 x 100 mL Pufferlösung
 Zusätzlich erforderlich:
 Calcium-Magnesium-Standard Best. Nr. CA ST
 Diaglobal-Rundküvetten Best. Nr. LH 075

Methode
 o-CPC-Methode¹⁾

Probenmaterial
 Heparinplasma oder Harn
 EDTA-Plasma nicht verwenden.
 Haltbarkeit im Plasma: bei +2°C bis +25°C: 10 Tage
 Haltbarkeit im Harn: bei +2°C bis +8°C: 7 Tage
 Um eine Ausfällung von Calciumsalzen zu verhindern, werden vor Beginn der Sammelperiode ca. 10 mL konz. Salzsäure in das Sammelgefäß gegeben.

Reagenz
 Inhalt / Konzentrationen:
 1. Farbreagenz
 o-Cresolphthalein-Komplexon 0,16 mmol/L; 8-Hydroxychinolin 7 mmol/L
 2. Pufferlösung
 Glycin 300 mmol/L; Natriumazid <0,1%; Triton X-100 < 1%

Sicherheitshinweis
 Das Farbreagenz enthält 0,2% 8-Hydroxychinolin
 H318: Verursacht schwere Augenschäden.
 H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
 H301: Giftig bei Verschlucken.
 H360D: Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
 P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
 P301+310: BEI VERSCHLÜCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
 P302+352: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.
 P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Die Pufferlösung enthält als Konservierungsmittel Natriumazid (< 0,1 %) und Triton X-100 (< 1%). Verschlucken, Berührung mit der Haut oder Schleimhäuten vermeiden
 Ein Sicherheitsdatenblatt steht auf unserer Webseite zur Verfügung.²⁾

Lagerung und Haltbarkeit
 Die Reagenzien sind bei +15°C bis +25°C bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfalldatum haltbar.

Messbedingungen
 Messgerät: VET Photometer Diaglobal
 Messwellenlänge: 520 nm
 Temperatur: Raumtemperatur

Messbereich
 0,10 - 5,00 mmol/L (0,40 - 20,0 mg/dL)
 Bei höheren Konzentrationen Probe 1+1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnen. Ergebnis x2
 Harn ggf. 1+2 (Ergebnis x 3) oder 1+4 (Ergebnis x5) verdünnen.

Hinweise
 1. Die Calciumbestimmung ist sehr empfindlich. Wir empfehlen die Verwendung von Einmalartikeln.
 2. Für die Plasmagewinnung vor Ort empfehlen wir eine Minizentrifuge (Best. Nr. DZ 002)

Arbeitsanleitung

In Rundküvetten pipettieren:			
	Leerwert	Standard	Analyse
Farbreagenz	1500 µL	1500 µL	1500 µL
Pufferlösung	1500 µL	1500 µL	1500 µL
Standard	--	50 µL	--
Probe	--	--	50 µL

Gut mischen. Sofort oder innerhalb von 1 Stunde Standard und Analyse gegen Leerwert messen.

- Test <CA> anwählen
- Küvette mit Reagenz in das Photometer einsetzen (Nullpunkteinstellung)
- Nach dem Signalton Küvette entfernen
- Küvette mit Standard in das Photometer einsetzen (die Standard-Extinktion wird im Display angezeigt)
- Küvette entfernen
- Küvette mit Probe (Analyse) in das Photometer einsetzen
- Ergebnis ablesen

Tipps
 Es können mehrere Küvetten gleichzeitig zur Messung vorbereitet werden, indem je 1500 µL Farbreagenz und 1500 µL Pufferlösung entsprechend der Analysenzahl in Diaglobal-Rundküvetten vorpipettiert werden.
 Haltbarkeit des pipettierten Reagenzes in der Küvette: 5 Stunden

Berechnung
 Calcium-Konzentration im Plasma/Harn:
 $c \text{ [mmol/L]} = 2,50 \times \text{Ext. Analyse} / \text{Ext. Standard}$
 $c \text{ [mg/dL]} = 10 \times \text{Ext. Analyse} / \text{Ext. Standard}$
 Umrechnung in mg/dL: mmol/L x 4,008 = mg/dL

Berechnung der Calciumausscheidung pro Tag:
 Calcium-Konz. [mmol/L] x 24 Std.-Harnvol. [L] = mmol Calcium/24 Std.

Qualitätssicherung
 Für die Qualitätssicherung empfehlen wir unsere Calcium- /Magnesium-Kontrolllösung CA QS.

Referenzwerte für Rinder

	mmol/L	mg/dL
Plasma	2,00 - 3,00	8,40 - 12,0

Zusammenfassung³⁾
 Etwa 99% des Calciums im Säugetierorganismus sind in der Knochensubstanz lokalisiert. Das restliche Calcium verteilt sich auf die übrigen Gewebe und extrazellulären Flüssigkeiten, wo es u.a. für die Funktion der Muskulatur und des Nervensystems, die Milchbildung und die Verdauung von Bedeutung ist.

Ausschlaggebend für die Steuerung des Calcium-Stoffwechsels ist der Calcium-Spiegel im Plasma.
 Calcium kommt im Plasma zu 55% als ionisiertes Calcium (Ca²⁺) vor, 40% sind an Protein und 5% an organische Säuren gebunden.
 Mit dem Diaglobal-Test CA 015 wird das Gesamt-Calcium bestimmt.

Bedeutung
 Die Calciumbestimmung nimmt eine Schlüsselrolle in der Diagnose, Prophylaxe und Therapie des Milchfiebers von Rindern ein, einer kurz nach der Kalbung auftretenden, durch verminderte Calcium-Werte gekennzeichneten Erkrankung.
 Bereits Calciumwerte zwischen 1,75 und 2,00 mmol/L führen zu typischen Symptomen (subklinisches Milchfieber), die eine Intervention erfordern.
 Bei Werten <1,75 mmol/L liegt eine akute Hypocalcämie (klinisches Milchfieber) vor, die zum Festliegen des Rindes führt und mit Symptomen wie Teilnahmslosigkeit, Untertemperatur, geringe Pansenaktivität und Rückgang der Milchleistung verbunden ist. Besonders gefährdet sind Hochleistungskühe, die aufgrund ihrer hohen Milchproduktion einen stark erhöhten Calciumbedarf aufweisen.

Messprinzip¹⁾
 Zur Messung der Calciumkonzentration im Serum haben neben der Flammenphotometrie photometrische Verfahren Bedeutung erlangt. Dem photometrischen Test von Diaglobal liegt die o-CPC-Methode zugrunde.
 Im alkalischen Milieu reagieren Calciumionen mit o-Cresolphthalein-Komplexon (o-CPC) zu einem violetten Farbkomplex.

$\text{Ca}^{2+} + \text{o-CPC} \rightarrow \text{Calcium-o-CPC}$
 Zusatz von 8-Hydroxychinolin zum Reagenz verhindert eine Interferenz durch Magnesium- und Eisenionen. Die Farbtintensität des gebildeten Komplexes ist der Calciumkonzentration im Serum direkt proportional. Die Auswertung erfolgt über Standard.

Leistungsmerkmale
Spezifität / Interferenzen
 Keine wesentliche Beeinflussung durch Hämoglobin (< 2,0 g/L) und Bilirubin (< 20 mg/dL). Starke Lipämie stört. Komplexbildende Antikoagulantien (EDTA, Citrat und Oxalat) dürfen nicht verwendet werden.

Schwache Komplexbildner, wie Gluconsäure und L-Milchsäure, die z.T. als Calciumsalze dem Tierfutter zugesetzt werden, stören nicht.

Unpräzision
 Die Reproduzierbarkeit wurde mit Kontrollproben, Humansenen und Rinderplasmen überprüft. Typische VK-Werte sind nachfolgend zusammengestellt.

Humanserum

In der Serie [n = 20]	Mittelwert [mmol/L]	Standard-Abweichung [mmol/L]	VK [%]
Probe 1	2,02	0,04	2,0
Probe 2	2,69	0,02	0,9
Probe 3	3,57	0,06	1,7

Von Tag zu Tag [n = 20]	Mittelwert [mmol/L]	Standard-Abweichung [mmol/L]	VK [%]
Probe 1	1,77	0,05	2,7
Probe 2	2,41	0,06	2,3
Probe 3	3,66	0,08	2,1

Rinderplasma

In der Serie [n = 20]	Mittelwert [mmol/L]	Standard-Abweichung [mmol/L]	VK [%]
Probe 1	1,66	0,02	1,4
Probe 2	2,31	0,04	1,8

Analytische Sensitivität
 Untere Nachweisgrenze: 0,10 mmol/L (0,4 mg/dL)

Methodenvergleich
 Ein Vergleich des Diaglobal-Tests CA 015 (y) mit der Originalmethode (x) (Spektralphotometer, Messung in Rechteckküvetten bei 578 nm) ergab nach dem Verfahren der linearen Regression die Korrelation:
 $y = 0,972x + 0,015$
 $r = 0,998$
 Probenmaterial: heparinisiertes Rinderplasma, n = 20
 Konzentrationsbereich: 0,8 - 3,5 mmol/L

Hinweise zur Entsorgung
 Abfallschlüsselnummer 180205:
 Küvetten mit Reagenz gelten als Sonderabfall. Reagenz nicht in Oberflächenwasser oder die Kanalisation gelangen lassen. Entsorgung gemäß den behördlichen Vorschriften. Nichtkontaminierte und restentleerte Verpackungen können einer Wiederverwertung zugeführt werden.

Literatur
 1. Sarkar R, Chauhan BC und UPS, Anal Biochem 1967; 20:155
 2. <http://www.diaglobal.de>
 3. Kraft W, Dürr U. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 6. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer, 2005:267

Reagent for quantitative In-vitro-determination of Calcium in plasma / urine of animals

Order No. CA 015
Contents 1 x 100 mL Colour reagent
 1 x 100 mL Buffer solution

Additionally needed:
 Calcium-Magnesium-Standard Order no. CA ST
 Diaglobal round cuvettes Order no. LH 075

Method
 o-CPC-method¹⁾

Sample material
 Heparinised plasma or urine
 Do not use EDTA-plasma
 Stability in plasma: at +2°C to +25°C: 10 days
 Stability in urine: at +2°C to +8°C: 7 days
 Sedimentation of calciumsalts can be prevented by adding of 10 mL concentrated hydrochloric acid.

Reagent
 Contents / concentrations:

- Colour reagent
 o-Cresolphthalein-complexone 0.16 mmol/L;
 8-Hydroxyquinoline 7 mmol/L
- Buffer solution
 Glycine 300 mmol/L; Sodium azide < 0.1%;
 Triton X-100 < 1%

Safety information
 Colour reagent contains 0.2% 8- Hydroxyquinoline
 H318: Causes serious eye damage.
 H317: May cause an allergic skin reaction.
 H301: Toxic if swallowed.
 H360D: May damage the unborn child.
 P201: Obtain special instructions before use.
 P280: Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection.
 P301+310: IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER / call a doctor.
 P302+352: IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
 P305 + P351 + P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

The reagents contain sodium azide (< 0.1 %) and Triton X-100 (< 1%). Do not swallow and avoid contact with skin and mucous membranes.

A safety data sheet is available on our website.²⁾

Storage and shelf life
 The reagents can be kept at a temperature between +15°C and +25°C until the expiry date indicated on the packaging.

Measurement conditions
 Measurement device: VET Photometer Diaglobal
 Meas. wavelength: 520 nm
 Temperature: Room temperature

Measurement range
 0.10 - 5.00 mmol/L (0.40 - 20.0 mg/dL)
 Should values exceed this range, dilute sample 1+1 with physiological saline solution. Multiply the result by 2.
 Dilute urine 1+2 (result x 3) or 1+4 (result x 5)

Notes
 1. The calcium assay is very sensitive. We recommend the application of disposables.
 2. For the "on-site" preparation of plasma we recommend a mini centrifuge (Order No. DZ 002)

Working instructions

Pipette into round cuvettes:

	Blank	Standard	Analysis
Colour reagent	1500 µL	1500 µL	1500 µL
Buffer solution	1500 µL	1500 µL	1500 µL
Standard	--	50 µL	--
Sample	--	--	50 µL

Mix well and measure immediately or within 1h standard and analysis against blank.

- Select the <CA> test
- Insert cuvette with reagent into photometer (blank value)
- Remove blank cuvette after signal ton
- Insert cuvette with standard into photometer (standard-absorption is shown on the display)
- Remove cuvette
- Insert cuvette with sample (Analysis) into photometer
- Read the result

Tip
 It is possible to prepare several vials for measurement at the same time by pre-pipetting 1500 µL of staining medium and 1500 µL of buffer solution into the appropriate number of Diaglobal round cuvettes. Shelf life of the pipetted reagents in the vial: 5 hours

Calculation
 Concentration of calcium in plasma/urine:
 $c \text{ [mmol/L]} = 2.50 \times \text{Abs. analysis} / \text{Abs. standard}$
 $c \text{ [mg/dL]} = 10 \times \text{Abs. analysis} / \text{Abs. standard}$
 Conversion in mg/dL: mmol/L x 4.008 = mg/dL

Calculation of release of calcium per day:
 Concentration of calcium [mmol/L] x 24h-Vol. of urine [L] = mmol calcium/24 h

Quality assurance
 For quality assurance we recommend our calcium - /magnesium - control solution CA QS.

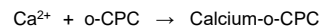
Reference values for cattle

	mmol/L	mg/dL
Plasma	2.00 - 3.00	8.00 - 12.0

Summary³⁾
 Approximately 99% of the calcium in mammalian organisms is localised in the bone structures. The remainder of the calcium is distributed around the other tissues and extracellular fluids, where it is important for, among other things, the functioning of the muscles and the nervous system, lactation and digestion. The calcium level in the plasma is key to controlling calcium metabolism. Fifty-five percent of the calcium in the plasma is ionised calcium (Ca²⁺), 40% is bound to protein and 5% to organic acids. The total calcium is determined using the Diaglobal CA 015 test.

Significance
 Determining the level of calcium plays a key role in the diagnosis, prophylaxis and treatment of milk fever in cows - a disease which occurs shortly after calving and is characterised by low calcium levels. Even calcium levels between 1.75 and 2.00 mmol/L lead to typical symptoms (subclinical milk fever) which require an intervention. At levels <1.75 mmol/L, acute hypocalcaemia occurs (clinical milk fever), which leads to the inability of the cow to stand and is associated with symptoms such as apathy, low temperature, low rumen activity and reduction in the milk output. High-yield cows which require increased levels of calcium due to their high milk production are at particular risk. The Diaglobal CA 015 test was designed for "on-site" use. The plasma needed for the determination can be extracted using a mobile mini centrifuge.

Measurement principle¹⁾
 In alkaline buffer solution, calcium forms with o-cresolphthalein-complexone (o-CPC) a violet dye.



Adding 8-hydroxyquinoline to the reagent avoids interferences by magnesium-ions and iron-ions. The colour intensity of Calcium-o-CPC is directly proportional to the concentration of calcium in serum. Calculation is due by standard.

Performance parameters
Specificity / interferences
 No significant impact caused by haemoglobin (< 2.0 g/L) and bilirubin (< 20 mg/dL). Severe lipidaemia interferes. Complexing anticoagulants (EDTA, citrate and oxalate) may not be used. Weak complexing agents such as gluconic acid and L-lactic acid, which are sometimes used as calcium salts in animal feed, do not interfere.

Inaccuracy
 The reproducibility was checked using control samples, human serums and cow plasmas. Typical VK values are shown below.

Human serum

In series [n = 20]	Average [mmol/L]	Standard deviation [mmol/L]	VK [%]
Sample 1	2.02	0.04	2.0
Sample 2	2.69	0.02	0.9
Sample 3	3.57	0.06	1.7

From day to day [n = 20]	Average [mmol/L]	Standard-deviation [mmol/L]	VK [%]
Sample 1	1.77	0.05	2.7
Sample 2	2.41	0.06	2.3
Sample 3	3.66	0.08	2.1

Cattle plasma

In series [n = 20]	Average [mmol/L]	Standard-deviation [mmol/L]	VK [%]
Sample 1	1.66	0.02	1.4
Sample 2	2.31	0.04	1.8

Analytic sensitiveness
 Lower detection limit: 0.10 mmol/L (0.40 mg/dL)

Comparison of methods
 A comparison of the Diaglobal test CA 015 (y) and the original methode (x) (Spectral photometer, measurement at 578nm) resulted in the following correlation according to the linear regression:
 $y = 0.972x - 0.015$
 $r = 0.998$
 Sample material: heparinised cattle plasma
 n = 20, concentration range: 0.8 - 3.5 mmol/L

Information on disposal
 Waste code number 180205:
 Vials with reagent are considered hazardous waste. Do not allow reagent to reach surface water or sewage system. Dispose of in accordance with official regulations. Non-contaminated and completely empty packaging can be recycled.

Bibliography
 1. Sarkar R, Chauhan BC und UPS, Anal Biochem 1967; 20:155
 2. <http://www.diaglobal.de>
 3. Kraft W, Dürr U. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 6. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer, 2005:267