

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; Hydroxychinolin
 7 mmol/L
 2. Pufferlösung
 Glycin 300 mmol/L; Natriumazid <0,1%; Triton X-100 < 1%

Sicherheitshinweis
 Die Pufferlösung enthält als Konservierungsstoff
 Natriumazid (< 0,1 %) und Triton X-100 (< 1%).
 Verschlucken, Berührung mit der Haut oder
 Schleimhäuten vermeiden.
 Ein Sicherheitsdatenblatt wird auf Anforderung zur
 Verfügung gestellt.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 physiologi-
 scher 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 die
 Diaglobal-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

Tip
 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: $\text{mmol/L} \times 4,008 = \text{mg/dL}$

Berechnung der Calciumausscheidung pro Tag:
 $\text{Calcium-Konz. [mmol/L]} \times 24 \text{ Std.-Harnvol. [L]} = \text{mmol Calcium/24 Std.}$

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.

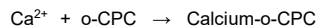
Ausschlaggebend für die Steuerung des Calcium-
 Stoffwechsels ist der Calcium-Spiegel im Plasma.

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 Hypo-
 calcämie (klinisches Milchfieber) vor, die zum Festliegen
 des Rindes führt und mit Symptomen wie
 Teilnahmslosigkeit, Untertemperatur, geringe Pansen-
 aktivität 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.



Zusatz von 8-Hydroxychinolin zum Reagenz verhindert
 eine Interferenz durch Magnesium- und Eisenionen.
 Die Farbintensität 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,
 Humanseren 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 180106:
 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/de/service/downloads/index.html>
 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:
 1. Colour reagent
 o-Cresolphthalein-complexone 0.16 mmol/L;
 Hydroxyquinoline 7 mmol/L
 2. Buffer solution
 Glycine 300 mmol/L; Sodium azide < 0.1%;
 Triton X-100 < 1%

Safety information
 The reagents contain sodium azide (< 0.1 %) and Triton X-100 (< 1%). Do not swallow and avoid contact with skin and mucous membranes.
 If desired a safety data sheet will be provided.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 the Diaglobal - 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

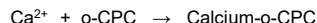
	mmol/L	mg/dL
Plasma	2.00 - 3.00	8.00 - 12.0

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 principle⁴⁾
 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 180106:
 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/de/service/downloads/index.html>
 3. Kraft W, Dürr U. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 6. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer, 2005:267