

Quantitative determination of Ceruloplasmin IVD

Store at 2-8°C.

INTENDED USE

The Ceruloplasmin reagent is a quantitative turbidimetric test for the measurement of Ceruloplasmin in human serum or plasma.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Anti-human Ceruloplasmin antibodies when mixed with samples containing Ceruloplasmin, form insoluble complexes. These complexes cause an absorbance change, dependent upon the Ceruloplasmin concentration of the patient sample, that can be quantified by comparison from a calibrator of known Ceruloplasmin concentration.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Caeruloplasmin is an α_2 -globulin that contains approximately 95% of total serum copper. Each molecule of caeruloplasmin contain six to eight copper atoms. The high content of copper ions gives caeruloplasmin a blue color. Caeruloplasmin can also bind, and possible transport, other cations such as magnesium. The molecule of caeruloplasmin has a single polypeptide chain and carbohydrate, and results a molecular mass of 132 kD. Caeruloplasmin is synthesized primarily by the hepatic cells and small quantities by macrophages and lymphocytes. Caeruloplasmin is most often quantified as a screening test for Wilson's disease. However, it is important to realize that several other factors, including diet, hormone levels, and other genetic disorders, can influence plasma levels. Synthesis of caeruloplasmin is increased modestly in the acute-phase response, peaking at 4 to 20 days after a single, cute insult. Synthesis is also stimulated by estrogens, and during pregnancy. Low plasma caeruloplasmin levels are due to lack of incorporation of Cu^{2+} into the molecule during synthesis. The causes are, the dietary insufficiency (including malabsorption), inability to release Cu^{2+} from gastrointestinal epithelium into circulation, or inability to insert Cu^{2+} into developing caeruloplasmin molecule. Levels may also be low in blood loss or gastrointestinal or renal proteinlosing syndromes.

REAGENTS

Diluent (R1)	Tris buffer 20 mmol/L, PEG 8000, pH 8.3. Sodium azide 0.95 g/L.
Antibody (R2)	Goat serum, anti-human Ceruloplasmin, pH 7.5. Sodium azide 0.95 g/L.
Optional	Cod: 1102003 PROT CAL.

CALIBRATION

The assay is calibrated to the Reference Material CRM 470/RPPHS (Institute for Reference Materials and Measurements). It must be used the PROT CAL to calibrate the reagent. The calibrator should not be diluted, as it is ready to use. The reagent, monoreagent and bireagent, should be recalibrated every three weeks and every month, respectively. It should also be recalibrated when the controls are out of specifications, and when changing the reagent lot or the instrument settings. For monoreagent, a reagent blank should be run daily before sample analysis.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

Reagent deterioration: The presence of particles and turbidity. Do not use.

Do not freeze; frozen Antibody or Diluent could change the functionality of the test.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Thermostatic bath at 37°C.
- Spectrophotometer or photometer thermostatable at 37°C with a 340 nm filter (320 – 360 nm).

SAMPLES

Fresh serum or plasma. EDTA or heparin should be used as anticoagulant. Stable 7 days at 2-8°C or 3 months at -20°C. The samples with presence of fibrin should be centrifuged. Do not use highly hemolyzed or lipemic samples.

PROCEDURE

1. Bring the reagents and the photometer (cuvette holder) to 37°C.
2. Assay conditions:
 - Wavelength : 340
 - Temperature : 37 °C
 - Cuvette light path : 1cm
3. Adjust the instrument to zero with distilled water.
4. Pipette into a cuvette:

Reagent R1	800 μL
Sample or Calibrator	7 μL

5. Mix and read the absorbance (A_1) after the sample addition.

6. Immediately, pipette into the cuvette:

Reagent R2	200 μL
------------	-------------------

7. Mix and read the absorbance (A_2) of calibrators and sample exactly 2 minutes after the R2 addition.

Spinreact has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

CALCULATIONS

$$\frac{(A_2 - A_1)_{\text{sample}}}{(A_2 - A_1)_{\text{calibrator}}} \times \text{Calibrator concentration} = \text{mg/dL Ceruloplasmin}$$

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of manual and automated assay procedures. Spinreact PROT CONTROL (Cod.:1102004). Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

Spinreact has instructions sheets available for several automatic analyzers.

REFERENCE VALUES

Between 15 – 60 mg/dL. Each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. **Linearity limit:** Up to 120 mg/dL, under the described assay conditions. Samples with higher concentrations, should be diluted 1/5 in NaCl 9 g/L and retested again. The linearity limit depends on the sample / reagent ratio. It will be higher by decreasing the sample volume, although the sensitivity of the test will be proportionally decreased.
2. **Detection Limit:** Values less than 3.27 mg/dL give non-reproducible results.
3. **Precision:** The reagent has been tested for 20 days, using three levels of serum in a EP5-based study (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	28.96mg/dL	55.47 mg/dL	76.54 mg/dL
Total	4%	2.3%	2%
Within Run	2.2%	1.5%	1%
Between Run	3.1%	1.1%	1.5%
Between Day	1.1%	1.3%	0.8%

4. **Accuracy:** Results obtained using this reagent (y) were compared to those obtained with a Bayer immunoturbidimetric method. 45 samples ranging from 20 to 80 mg/dL of Ceruloplasmin were assayed. The correlation coefficient (r) was 0.96 and the regression equation $y = 0.896x + 10.57$.

The results of the performance characteristics depend on the used analyzer.

INTERFERENCES

Hemoglobin (20 g/L), bilirubin (40 mg/dL), lipemia (< 2.5 g/L), and rheumatoid factor (800 IU/mL) do not interfere. Other substances may interfere.

BIBLIOGRAPHY

1. Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
3. Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1966; 14: 401-406.
4. Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997
5. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PACKAGING

Ref.: 1102064

Cont.	R1. Diluent: 1 x 40 mL R2. Antibody: 1 x 10 mL
-------	---

Determinación cuantitativa de Ceruloplasmina IVD

Conservar a 2 - 8°C.

USO PREVISTO

El reactivo Ceruloplasmina es un ensayo turbidimétrico para la cuantificación de Ceruloplasmina en suero o plasma humano.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los anticuerpos Ceruloplasmina forman compuestos insolubles cuando se combinan con la Ceruloplasmina de la muestra del paciente, ocasionando un cambio de absorbancia proporcional a la concentración de Ceruloplasmina en la muestra, y que puede ser cuantificada por comparación con un calibrador de Ceruloplasmina de concentración conocida.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La Ceruloplasmina es una α_2 -globulina que contiene aproximadamente el 95% del total del cobre en suero. Cada molécula de Ceruloplasmina contiene de 6 a 8 átomos de Cobre. El elevado contenido de iones Cobre confiere a la molécula el color azul que presenta. La Ceruloplasmina también se puede unir, y probablemente transportar, otros cationes como el magnesio. La molécula de ceruloplasmina es una cadena simple polipeptídica con carbohidratos, y tiene un peso molecular de 132KD. Ceruloplasmina es sintetizada principalmente por células hepáticas, y en pequeñas cantidades por macrófagos y linfocitos.

El test de Ceruloplasmina se utiliza muy frecuentemente como método de screening para la detección de la enfermedad de Wilson. Sin embargo, es importante tener en cuenta que muchos factores pueden influir en los niveles de plasma, incluida la dieta, los niveles de hormonas, y otros desórdenes genéticos.

La síntesis de ceruloplasmina se ve ligeramente incrementada en la respuesta de fase aguda. Su síntesis también se ve estimulada por la presencia de estrógenos, y durante el embarazo.

Niveles bajos de Ceruloplasmina en plasma se deben a la pérdida de la incorporación de Cu^{+2} durante la síntesis de la molécula. Las causas son la insuficiencia dietética (incluyendo malabsorción), dificultad para liberar Cu^{+2} del epitelio gastrointestinal a la circulación, o dificultad para insertar Cu^{+2} en el desarrollo de la molécula de Ceruloplasmina. Los niveles también serán bajos en síndromes gastrointestinales o que impliquen pérdida de sangre o pérdida de proteínas renales.

REACTIVOS

Diluyente (R1)	Tampón tris 20 mmol/L, g/L, PEG 8000, pH, 8,3. Azida sódica 0,95.
Anticuerpo (R2)	Suero de cabra, anti-ceruloplasmina humana, pH 7,5. Azida sódica 0,95 g/L.
Opcional:	Ref: 1102003 PROT CAL.

CALIBRACIÓN

El ensayo está calibrado frente a un Material de Referencia CRM 470/RPPHS (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM). Se recomienda el uso del Calibrador PROT CAL para la Calibración. El reactivo (tanto monoreactivo como bireactivo) se debe recalibrar cada tres semanas, cuando los controles están fuera de especificaciones, y cuando el lote de reactivo o la configuración del instrumento cambia. En el caso de monoreactivo debe correrse un blanco de reactivo antes de las muestras.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No utilizar reactivos que hayan sobrepasado la fecha de caducidad.

Indicadores de deterioro: La presencia de partículas y turbidez.

No congelar; la congelación del Anticuerpo o Diluyente puede afectar la funcionalidad de los mismos.

MATERIAL ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C.
- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatzable a 37°C para lecturas a 340 nm (320-360 nm).

MUESTRAS

Suero o plasma fresco, recogido con heparina o EDTA como anticoagulantes. Estable 7 días a 2-8°C o 3 meses a -20°C.

Las muestras con restos de fibrina deben centrifugarse. No utilizar muestras altamente hemolizadas o lipémicas.

PROCEDIMIENTO

1. Calentar los reactivos y el fotómetro (portacubetas) a 37°C.

2. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 340 nm

Temperatura: 37°C

Paso de luz de la cubeta: 1 cm

3. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

4. Pipetear en una cubeta:

Reactivo R1 (µL)	800
Muestra o Calibrador (µL)	7

5. Mezclar y leer la absorbancia (A_1) después de la adición de la muestra.

6. Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:

Reactivo R2 (µL)	200
------------------	-----

7. Mezclar y leer la absorbancia (A_2) exactamente después de 2 minutos de añadir el reactivo R2.

Spinreact dispone de adaptaciones detalladas a la mayoría de analizadores automáticos del mercado. Solicite la información a su distribuidor.

CÁLCULOS

$(A_2 - A_1)_{\text{muestra}}$

x Concentración del Calibrador = mg/dL Ceruloplasmina

$(A_2 - A_1)_{\text{Calibrador}}$

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático. Debe usarse el control de SPINREACT PROT CONTROL (Ref.: 1102004).

Cada laboratorio debería establecer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

VALORES DE REFERENCIA

Entre 15 – 60 mg/dL. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

1. **Rango de medida:** hasta 120 mg/dL, en las condiciones descritas del ensayo. Las muestras con valores superiores deben diluirse 1/5 con NaCl 9 g/L y ensayarse de nuevo. El intervalo de medida depende de la relación muestra/reactivo. Disminuyendo el volumen de muestra, se aumenta el límite superior del intervalo de medida, aunque se reduce la sensibilidad.

2. **Límite de detección:** valores por debajo de 3.27 mg/dL dan lugar a resultados poco reproducibles.

2. **Precisión:** El reactivo ha sido probado durante 20 días con tres niveles diferentes de suero en un estudio basado en las normas EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	28.96 mg/dL	55.47 mg/dL	76.54 mg/dL
Total	4%	2.3%	2%
Within Run	2.2%	1.5%	1%
Between Run	3.1%	1.1%	1.5%
Between Day	1.1%	1.3%	0.8%

6. **Exactitud:** El comportamiento de este método (y) fue comparado con el obtenido usando el método turbidimétrico de Bayer. 45 muestras de concentraciones de Ceruloplasmina entre 20 y 80 mg/dL fueron analizadas con ambos métodos. El coeficiente de regresión (r) fue de 0.96 y la ecuación de la recta de regresión $y = 0.896x + 10.57$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Bilirrubina (40 mg/dL), hemoglobina (20 g/L), Lípidos (< 2.5 g/L) y factores reumatoideos (800 UI/mL), no interfieren. Otras sustancias pueden interferir.

BIBLIOGRAFÍA

- Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
- Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
- Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1966; 14: 401-406.
- Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PRESENTACIÓN

Ref.: 1102064

Cont.

R1 Diluyente: 1 x 40 mL

R2 Anticuerpo: 1 x 10 mL