

25 羟基维生素 D 检测试剂盒（酶联免疫法）说明书

货号：AC-57F1

【产品名称】

通用名称：25 羟基维生素 D 检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名称：OCTEIA 25-Hydroxy Vitamin D

【包装规格】 96 人份/盒

【预期用途】

仅供体外诊断使用。

25 羟基维生素 D 检测试剂盒（酶联免疫法）是一种酶联免疫测定，用于定量测定人血清或血浆中的 25 羟基维生素 D 和其他羟基化代谢物。结果应与其他临床和实验室数据相结合，以辅助临床医师对成人维生素 D 缺乏的评估。

【概要说明】

1. 维生素D是一个常用于与脂溶性类固醇衍生物（secosteroids）紧密相关的家族的总称。在阳光照射下，位于表皮中生长活跃层深处的7-脱氢胆固醇经“B”链的光裂解生成维生素D₃前体，即维生素D₃异构体。维生素D₃和维生素D₂也可通过饮食补充获得且来自于有限的食物数量。维生素D₂与维生素D₃的代谢方式类似。

2. 维生素D存在于脂肪组织当中，与维生素D结合蛋白（VDBP）和白蛋白结合进入循环系统。在肝脏中，维生素D羟化为25羟基维生素D，仍与VDBP结合进行循环。一小部分25-OH D 在甲状旁腺激素和核钙离子水平的直接调节下在肾脏中进一步羟化，形成有生物活性的钙调节素1,25双羟基维生素D。维生素D进一步羟化和代谢产生水溶性和易分泌的复合物。

3. 肝脏维生素D₂₅羟化酶活性未能紧密调节，且皮肤中维生素D₃的改变或维生素D（D₃或D₂）的摄取将取决于25-OH D循环水平的改变⁽¹⁾。

4. 血清25羟基维生素D浓度被认为是测定全面维生素D状态的最可靠的指标，因而可用于测定患者是否出现维生素D缺乏⁽²⁾。维生素D状态的评估可用于确定导致患者血清钙浓度异常的原因。

【检验原理】

25 羟基维生素 D 检测试剂盒（酶联免疫法）是一种酶联免疫测定，用于定量测定人体血清或血浆中的 25 羟基维生素 D 和其他羟基化的代谢产物。标准品、质控品和样本被标记有 25 羟基维生素 D 的生物素稀释。稀释后的样本在包被了高特异性羊 25-OH D 抗体的微孔中室温孵育 2 小时后冲洗。加入酶（辣根过氧化物酶）标记的抗生物素蛋白并有选择的与复合生物素结合，接着冲洗，再利用底物（TMB）显色。终止反应后采用酶标仪读取吸光度，颜色强度与 25-OH D 浓度成反比。

【主要组成成份】

1. **CAI** 0-6- 标准品（货号：AC-5701A 至 AC-5701G）

含 25 羟基维生素 D 和 <0.09% 叠氮化钠的缓冲人

血清，每瓶 1 ml，每盒 7 瓶。

2. **MICROPLAT** -包被抗体的酶标板（货号：AC-5702W）

孔内包被羊抗-25-OH-VD 多克隆抗体，酶标板 12 × 8 孔条，包装于带干燥剂的箔袋中。

3. **25D BIOTIN** **50×** -25D 生物素结合物（货号：AC-5703）

含生物素标记的 25-OH-VD 和稳定剂，每瓶 1 ml。

4. **BUF**-缓冲液（货号：AC-5701A-AC-5703B）

用于分离 25-OH-VD 于结合蛋白，每瓶 50ml。

5. **ENZYMCONJ**-酶结合物（货号：AC-5704）

含辣根过氧化物酶标记的抗生物素蛋白、蛋白质、酶稳定剂和防腐剂的磷酸缓冲液，每瓶 22 ml。

6. **CTRL**1-2 质控品（货号：AC-5705A 和 AC-5705B）

含 25-OH-VD 和 <1% 叠氮化钠的人血清冻干品，每盒 2 小瓶，每瓶 1 ml 。

7. **SUBS**-TMB 底物（货号：AC-SUBS）

四甲基联苯胺（TMB）和过氧化氢的液体组成物，每瓶 28 ml。

8. **HCL**-终止液（货号：AC-STOP）

0.5M 的氢氯酸，每瓶 13 ml。

9. **WASHBUF** **20×**—浓缩洗液（货号：AC-WASHL）

含吐温的磷酸缓冲液，每瓶 50ml。

10. 封板膜 8 张/盒。

11. 文件 说明书和质控报告单（QC）。

【储存条件及有效期】

试剂盒自生产之日起在 2-8℃ 下可保存 12 个月。

复溶后的质控品和 25D 生物素溶液在 2-8℃ 下可保存 8 周。

未用完的包被抗体的酶标板条应放回有干燥剂的铝箔袋中，将铝箔袋折好并密封于塑料封口袋中，2-8℃ 可保存 8 周。

洗液在室温下保存可长达 8 周。

【样本要求】

采用血清或血浆（EDTA 或肝素）样本。样本收集之后应尽快分离，血清或血浆样本在 2-8℃ 下可保存 2 天，-20℃ 下可保存一个月，-80℃ 可保存三年。避免样本反复冻融。整个实验应使用相同的样本类型。

【检验方法】

1. 自备材料

1) **12×75 mm**的玻璃或聚丙烯试管；

注意：聚苯乙烯试管不适合。不要重复使用试管。

2) 可移取 25μL 和 200μL 的高精度移液器；

3) 可重复分配 1mL 的移液器，如 Eppendorf 4780 或类似的；

4) 可移取 100μL 和 200μL 的高精度多道移液器；

- 5) 漩涡振荡混合器;
- 6) 自动洗板机 (可选项);
- 7) 酶标仪和数据分析软件。

2. 试剂准备

1) 质控品: 质控品以冻干品形式提供。将其复溶在 1ml 蒸馏水或去离子水中。盖好瓶盖室温下放置 10~15 分钟, 倒转几次确保充分溶解。保存于 2-8℃。

2) 25D 生物素: 冻干品形式提供, 加 3 mL 缓冲液至 25D 生物素的小瓶 (蓝色), 盖紧瓶盖室温下放置 10-15 分钟, 倒转几次确保充分溶解。将 3ml 复溶的 25D 生物素溶液倒回到装有缓冲液的小瓶内。盖紧瓶盖, 使 25D 生物素溶液与瓶内剩余的缓冲液充分混合, 此时的 25D 生物素溶液 (50 ml) 为绿色。标记该瓶子为“25D 生物素溶液”, 保存于 2-8℃。

3) 浓缩洗液: 将浓缩洗液加入至 950ml 的去离子水或蒸馏水中, 充分混合, 室温保存。

其他试剂直接使用。

所有试剂使用前恢复至室温, 反复倒转使其混合均匀。

3. 操作步骤

试剂复溶或准备见“试剂准备”。

1) 取已标记的玻璃或聚丙烯试管, 标准品、质控品和样本各准备一个。

2) 标准品、质控品和样本各取 25μl 分别加入到相应标记好的试管中。

3) 再加入 25D 生物素溶液 1ml 至所有试管中。用漩涡振荡混合器混合 10 秒。

4) 加入已稀释的标准品、质控品或样本各 200μl 于相应的酶标板微孔内。

贴上封板膜, 于 18-25℃ 下温育 2 小时。

5) 用稀释好的洗液洗板 3 次

a. 自动洗板: 设置洗板机分配每孔至少 300μl 洗液。重复洗 3 次。

b. 手动洗板: 迅速颠倒倒出孔内物。每孔加入 250μl 冲洗液。再重复洗板 2 次。

在进入下一步前, 于吸水纸上用力拍打倒置的板以去除多余的洗液。

6) 采用多道移液器加入酶结合物 200μl 至所有微孔内。贴上封板膜, 于 18-25℃ 下温育 30 分钟。

7) 重复步骤 5)。

8) 每孔加入底物 200μl。

贴上封板膜, 于 18-25℃ 下温育 30 分钟。

注: 底物溶液易受到污染。仅移取检测所需要的量, 丢弃没用完的 TMB 底物, 请勿再倒回瓶内。

9) 每孔加入终止液 100μl。

10) 加入终止液后的 30 分钟内在 450nm (参考 650nm) 波长处读取吸光度。

【参考值】

每个实验室应建立当地人群的参考值范围。

25 羟基维生素 D 浓度尚未有普遍认同的最佳浓度值。参考值应基于临床上对所有年龄各种性别确定的值, 而不只是基于人群的参考值范围。因此, 应开展大型的研究来调查血清中全段甲状旁腺激素与维生素 D 水平的关联。全段甲状旁腺激素的值在 ~30ng/mL³。同样地, 钙吸收增强时, 25-OH D 水平也升高, 直至达到 ~30ng/mL⁴。

有许多因素会影响 25 羟基维生素 D 值, 如饮食、当天的时间、太阳照射、季节⁵、地理位置⁶、年龄⁷、遮阳工具的使用及或防护服的穿戴^{8、9}和皮肤色素沉着¹⁰。因此, 显著健康个体组采样并不是建立参考值范围的理想途径。

美国国家骨质疏松基金会推荐水平 >30ng/mL 可保护骨健康¹¹。同时, 美国国家肾病基金会认为水平 <30ng/m 为缺乏或不足¹²。根据当前的文献回顾, 25 羟基维生素 D 水平推荐为:

水平	范围	
	nmol/L	ng/mL
缺乏	<25	<10
不足	25-74	10-29
充足	75-250	30-100
潜在中毒	>250	>100

以下范围是应用 IDS 25 羟基维生素 D 检测试剂盒 (酶联免疫法) 检测得到的, 仅供参考。

每个实验室应建立当地人群的参考值范围。

正常健康成人: 47.7-144 nmol/L (n=36)

【检验结果的解释】

计算标准品、质控品或者样本的百分结合率 (B/B₀%)

$$B/B_0\% = \frac{\text{吸光度均值}}{\text{标准品0吸光度均值}} \times 100$$

绘制标准曲线: 以 B/B₀% 为纵坐标, 25-OH-VD 浓度为横坐标, 在半对数坐标纸上做出一条标准曲线。每个待测样本都计算 B/B₀%, 在标准曲线上找对应的 25-OH-VD 浓度值 (nM)。

可采用选择性数据压缩技术, 但是应确认该选择的曲线是合适的且提供满意的结果。

推荐光滑曲线或 4PL 曲线。

单位间的转化:

$$X \text{ nmol/L} \times 0.40 = Y \text{ ng/mL} \quad \text{或} \quad Y \text{ ng/mL} \times 2.5 = X \text{ nmol/mL}$$

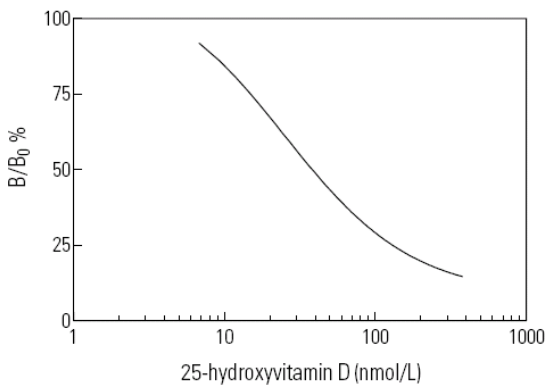
样本分析数据

分析数据只作例证用, 不能作为任何样本结果的计算。

孔号	项目	吸光率	平均值	B/B ₀ %	结果 nmol/L
A1A2	标准品 0 0nmol/L	2.476 2.530	2.503		
B1B2	标准品 1 6.8nmol/L	2.313 2.288	2.301	91.9	
C1C2	标准品 2 14nmol/L	1.912 1.908	1.910	76.3	
D1D2	标准品 3 27nmol/L	1.495 1.499	1.497	59.8	
E1E2	标准品 4 67nmol/L	0.919 0.905	0.912	36.4	
F1F2	标准品 5 179nmol/L	0.521 0.522	0.522	20.8	
G1G2	标准品 6 380nmol/L	0.372 0.368	0.370	14.8	
H1H2	样本 1	1.237 1.257	1.247	49.8	39
A3A4	样本 2	0.951 0.969	0.960	38.4	62
B3B4	样本 3	0.591 0.612	0.602	24.0	138

典型标准曲线

该曲线只作例证，不作为任何样本结果的计算。



【检验方法的局限性】

1. 若样本的浓度超过最高标准品的浓度，使用前应对样本进行稀释。
2. 诊断结果应结合患者的临床症状和临床医生所知的其他信息进行解析。
3. 在儿科人群中，本测定的性能指标未能建立。
4. 抗生物素蛋白引发的特高滴度抗体可能会产生一些干扰，这种情况非常罕见。

经实验证实，下列物质在此浓度以下时不会对本测

试有干扰：

血红蛋白	检测高达 1470 mg/dL 时
胆红素	检测高达 513 μmol/L 时
油脂	检测高达 5.6 mmol/L 时

【产品性能指标】

1. 精确度

以IDS的25羟基维生素D检测试剂盒（酶联免疫法）与公认的定量检测25羟基维生素D和其他羟化产物的放射性免疫测定进行对比。选择代表较大25羟基维生素D范围 [9.3-151.2nmol/L]的180个样本通过每种方法检测。基于比较数据的基础上进行最小二乘回归分析：

$$IDS=1.01(X)+0.7; \text{ 相关系数}(r)=0.91$$

2. 灵敏度

灵敏度（定义为 0 标准品 10 次重复测定的吸光度均值减去 2 个标准差对应的浓度）为 5 nmol/L。

3. 精密度

批内分析 n=10		批间分析 n=10	
均值 (nmol/L)	%CV	均值 (nmol/L)	%CV
39.0	5.3	40.3	4.6
67.1	5.6	72.0	6.4
165	6.7	132	8.7

4. 回收率

在测定前，通过在样本中加入 25-OH D 来评估回收率。

样本	测得值 nmol/L	期望值 nmol/L	回收率 %
A	122	126	97
A	95.6	98.4	97
B	147	141	104
B	123	118	105
		均值	101

5. 线性

分析前用缓冲液（PBS包含9%的BSA）稀释样本以评估线性。

样本	测得值 (nmol/L)	预期值 (nmol/L)	%M/EXP
----	-----------------	-----------------	--------

A	83.9		
A/2	41.0	42.0	98
A/4	20.8	21.0	99
A/8	13.1	10.5	125
B	83.9		
B/2	43.5	42.0	104
B/4	23.1	21.0	110
B/8	10.7	10.5	102
C	104		
C/2	45.9	52.0	88
C/4	22.5	26.0	87
C/8	14.1	13.0	108
		平均值	102

6. 特异性

在标准品050%的结合率时，用以下分析物评估抗血清的特异性。

分析物	交叉反应
25羟基维生素 D3	100%
25羟基维生素 D2	75%
24,25 双羟基维生素 D3	>100%
维生素D3 (D3)	<0.01%
钙化醇 (D2)	<0.30%

【注意事项】

1. 本试剂盒仅供人和动物体外诊断，不得内用，必须严格按照说明书进行操作。由于不按说明书操作引起的损失和伤害（除了法令特别要求的），IDS 公司不承担任何由此引发的责任。

2. 本试剂盒包含人和/或动物来源的材料。盒中试剂应作为有潜在传染源来处理。储藏、操作和处理试剂应有适当的预防措施和良好的实验室操作。试剂的处理应当符合当地法令。

3. 人血清：本产品所用到的标准品和质控品在制备过程中使用到的人源性材料经过 HIV I & II & HBV & HCV 检测(FDA 推荐)呈阴性。因为没有任何测试能完全保证传染源的不存在，所有试剂应该按照生物安全 2 级水平处理；

4. 试剂盒中的某些试剂以叠氮化钠作为防腐剂，可与铅、铜或黄铜反应形成高爆炸性的金属叠氮化合物，处理时应用大量的水进行冲洗，避免形成叠氮化合物。

5. 终止液包含 0.5M 氯化氢溶液。

R36/38 对眼睛和皮肤有刺激。

S26 如不慎与眼接触，立刻以大量的水清洗，并寻求医师帮助。

S36/37 穿戴适当的防护服和手套。

6. 四甲基联苯胺

TMB 底物包含 3,3',5,5'-四甲基联苯胺

S21/22 皮肤接触或吞咽都是有害的，

S36/37 穿戴适当的防护服和手套。

7. 试剂可能变坏的迹象

任何一个试剂中有反常微粒子出现。

标准品 0 吸光率下降。

曲线范围偏离正常位置。

【参考文献】

- Reichel, H., Koeffler, H.P., Norman, A.W. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. N. Engl. J. Med. 320: 981-991. (1989)
- Holick, M.F., Vitamin D: Photobiology, Metabolism, etc., In "Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism", American Society for Bone and Mineral Research., 3rd Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 74-81. (1996).
- Chapuy M-C, Preziosi P, Maamer M, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. Osteoporos Int 1997;7: 439-443.
- Heaney, RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. Am J Clin Nutr 2004;80 (suppl):1706S-1709S.
- Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr 2004; 80: 1678S - 1688S.
- Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. J Clin Endocrinol Metab 1988;67: 373-378.
- Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D and solar ultraviolet. Lancet 1989;ii:1104-1105.
- Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J et al. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D3 synthesis. J Clin Endocrinol Metab 1987;64:1165-1168.
- Salih FM. Effect of clothing varieties on solar photosynthesis of previtamin D3: an in vitro study. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2004;20: 53-58.
- Clemens TL, Henderson SL, Adams JS, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesize vitamin D3. Lancet 1982;9:74-76.
- National Osteoporosis Foundation. Prevention - Vitamin D. <http://www.nof.org/prevention/vitaminD.htm>
- KDOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Children With Chronic Kidney Disease. http://www.kidney.org/PROFESSIONALS/kdoqi/guidelines_pedbone/guide8.htm Doc: AC-57PL-A

Issue: 8

2009年8月4日

【生产企业及售后服务单位】

生产者名称：英国 Immunodiagnostic Systems Limited (IDS Ltd)

生产者/生产场所地址：10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK

电话：+44 (0) 191 519 0660

传真：+44 (0) 191 519 0760

网址：www.idsltd.com

售后服务机构：北京荣志海达生物科技有限公司

地址：北京市海淀区永定路 88 号长银大厦 12 层 B12 室

电话：010-58895646 020-32293178

传真：010-58895611 020-32293177

电子邮箱：info@rz-biotech.com

网址：www.rz-biotech.com

【医疗器械注册证书编号】

国食药监械（进）字 2011 号第 2403360 号

【产品标准编号】YZB/UK 4271-2011

【说明书批准及修改日期】2011 年 10 月 25 日