

کیت اندازه گیری هورمون کورتیزول در سرم انسان
Cortisol ELISA Kit 96t
 Cat. No: 2924-96 / Rev: B4 (1404/09/08)

مقدمه:

کورتیزول یا هیدروکورتیزون، یک هورمون استروئیدی ۲۱ کربنه می باشد که توسط قشر آدرنال تولید می شود. کورتیزول همانند سایر استروئیدهای آدرنال از کلسترول سنتز می شود و ترشح آن توسط محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال کنترل می شود. در شرایط استرس، فعالیت های بدنی و یا هیپوگلیسمی، هورمونی به نام CRH از هیپوتالاموس ترشح می گردد که باعث آزادسازی هورمون ACTH از هیپوفیز قدامی می شود. ACTH با تاثیر روی واکنش تبدیل کلسترول به پرگنولون، موجب افزایش سنتز و ترشح کورتیزول می شود. مهمترین اثرات کورتیزول در بدن شامل تغییر فرایندهای متابولیک و تنظیم پاسخ های ایمنی است. افزایش مقدار کورتیزول در سندرم کوشینگ، چاقی، بارداری و هیپرتیروئیدی دیده می شود. کاهش کورتیزول خون در بیماری هایی نظیر آدیسون، هیپوپلازی مادرزادی قشر آدرنال، هایپوپیتویتاریسم، هایپوتیروئیدی و بیماری های کبدی مشاهده شده است. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری میزان کورتیزول در سرم یا پلاسمای انسان می باشد.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای رقابتی طراحی شده است. با اضافه شدن آنتی ژن کونژوگه شده با آنزیم HRP، سرم حاوی آنتی ژن آزاد و سپس آنتی بادی بیوتینیل به چاهک های حاوی استرپتاویدین تثبیت شده، کمپلکس های ایمنی از طریق واکنش بیوتین با استرپتاویدین، به کف چاهک متصل می شوند. پس از شستشوی چاهک ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. شدت رنگ و میزان جذب با غلظت کورتیزول نمونه و کالیبراتورها، نسبت معکوس دارد. در نهایت، غلظت کورتیزول در نمونه ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
 - ۲) کالیبراتورها (Cortisol Cal A-F): شش ویال با غلظت های ۰، ۰.۱، ۰.۴، ۱.۰، ۲.۰ و ۵۰ µg/dL تهیه شده از سرم انسان.
 - ۳) محلول کونژوگه آنزیمی (Cortisol Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی ژن متصل به آنزیم HRP.
 - ۴) محلول کونژوگه بیوتینی (Cortisol Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی بادی ضد کورتیزول متصل به بیوتین.
 - ۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.
 - ۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
 - ۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
 - ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
 - ۹) محلول کنترل (Cortisol Control): ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری.
 - ۱۰) برچسب مخصوص پلیت یک ورق.
- توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
- توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

- ۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

- ۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBsAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی

بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های ایمنی انجام شوند.

۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.

۶) نمونه بیماران، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

- ۱) نمونه های مناسب برای این آزمایش سرم یا پلاسمای هپارینه می باشد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- ۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- ۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از متجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

آماده سازی و نگهداری معرف ها:

- ۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

۲) آماده سازی محلول رنگزا: قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل ها یا نمونه ها را در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.

۳) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهک ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۵) چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۶) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه نمایید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده، (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

1. <http://www.idealdiag.com/Training.aspx>

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های ایپزا پروسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

۴) بررسی درستی - آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت Cortisol در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias < 10% است.

No.	Sample (µg/dL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	9.6	1.2	-1.5	-2.2	-2.6
2	14.4	2.4	1.9	-1.8	-2.3
3	22.3	5.4	-0.7	0.8	-4.4

۵) بررسی ویژگی - آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش به کمک اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مندرج در جدول زیر به نمونه‌های سرم، ارزیابی شده است. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده اضافه شده به مقدار Cortisol مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، بررسی شده است. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده ۱۰±۱۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Analyte	Cross Reactivity
Cortisol	1.0000
Androstenedione	0.0004
Cortisone	0.2300
Corticosterone	0.1800
11-Deoxycortisol	0.0550
Dexamethasone	0.0001
Progesterone	0.0002
17α-OH Progesterone	ND
DHEA	ND
Estradiol	ND
Estrone	ND
Danazol	ND
Testosterone	ND

۶) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با $0.4 \mu\text{g/dL}$ تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SDs}$$

$$\text{LOB} = \text{Meanb} + 1.645 \text{ SDb}$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۷) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای کورتیزول

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این آزمایش را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Population	Morning	Afternoon
Adult	5-23 µg/dL	3-13 µg/dL
Child	3-21 µg/dL	3-10 µg/dL
Newborn	1-24 µg/dL	-

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV < 10% است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean Cortisol (µg/dL)	3.21	14.77	22.1
S.D (µg/dL)	0.18	0.79	1.12
C.V (%)	5.6	5.3	5

۲) بررسی دقت - آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

دقت بین‌تستی با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV < 10% است.

Serum sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean Cortisol (µg/dL)	2.4	12.65	18.64
S.D (µg/dL)	0.14	0.72	0.98
C.V (%)	5.8	5.7	5.2

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، غلظت Cortisol در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias < 10% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

NO.	Sample (µg/dL)	Added (µg/dL)	Exp. (µg/dL)	Obs. (µg/dL)	% Rec
1	3.5	12.3	7.9	8	101.2
2	21.4	6.7	14.05	13.8	98.22
3	13.5	21.8	17.6	17.4	98.8

۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها ریخته و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید.

۹) مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر (حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش) بخوانید. در این آزمایش محاسبه غلظت به روش Point to Point و 4PL (یا Logic-log) قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به عنوان مثال 0.01 µg/dL) در نظر بگیرید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (µg/dL)
Cal. A	A1	2.273	2.364	0
	B1	2.455		
Cal. B	C1	1.922	1.946	1
	D1	1.970		
Cal. C	E1	1.594	1.598	4
	F1	1.603		
Cal. D	G1	1.091	1.088	10
	H1	1.085		
Cal. E	A2	0.736	0.738	20
	B2	0.741		
Cal. F	C2	0.361	0.355	50
	D2	0.349		

