MONOKIT

کیت اندازه‌گیری هورمون کورتیزول در سرم انسان
Cortisol ELISA Kit 96t
Cat. No: 2934-96 /Rev: A1 (1402/09/25)

مقدمه:

کورتیزول یا هیدروکورتیزون، یک هورمون استروئیدی ۲۱ کربنه می‌باشد که توسط قشر آدرنال تولید می‌شود. کورتیزول همانند سایر استروئیدهای آدرنال از کلسترول سنتز می‌شود و ترشح آن توسط محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال کنترل می‌شود. در شرایط استرس، فعالیت‌های بدنی و یا هیپوگلیسمی، هورمونی به نام CRH از هیپوتالاموس ترشح می‌گردد که باعث آزادسازی هورمون ACTH از هیپوفیز قدامی می‌شود. ACTH با تأثیر روی واکنش تبدیل کلسترول به پرگننولون، موجب افزایش سنتز و ترشح کورتیزول می‌شود. مهمترین اثرات کورتیزول در بدن شامل تغییر فرایندهای متابولیک و تنظیم پاسخ‌های ایمنی است. افزایش مقدار کورتیزول در سندرم کوشینگ، چاقی، بارداری و هیپرتیروئیدی دیده می‌شود. کاهش کورتیزول خون در بیماری‌هایی نظیر آدیسون، هیپوپلازی مادرزادی قشر آدرنال، هایپوپیتوئیتاریسم، هایپوتیروئیدی و بیماری‌های کبدی مشاهده شده است. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری میزان کورتیزول در سرم یا پلاسمای انسان به روش الایزا می‌باشد.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس الایزای رقابتی طراحی شده است. با اضافه شدن آنتی‌ژن کونژوگه شده با آنزیم HRP، سرم حاوی آنتی‌ژن آزاد و سپس آنتی‌بادی بیوتینیله به چاهک‌های حاوی استرپتاویدین تثبیت شده، کمپلکس‌های ایمنی از طریق واکنش بیوتین با **استرپتاویدین**، به کف چاهک متصل می‌شوند. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول‌موج 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 نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲. کالیبراتورها (Cortisol Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۱، ۴، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ µg/dL تهیه شده از سرم انسان.
۳) محلول کونژوگه آنزیمی (Cortisol Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP.
۴) محلول کونژوگه بیوتینی (Cortisol Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد کورتیزول متصل به بیوتین.
۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۹) محلول کنترل (Cortisol Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۰) بر چسب مخصوص پلیت یک ورق.
توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش‌گر 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 کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نشود.
۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBsAg، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های 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 جلوگیری نمایید.
۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱) نمونه‌های مناسب برای این آزمایش سرم یا پلاسمای هپارینه می‌باشد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری نمایید.
۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. 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 نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل‌ها یا نمونه‌ها را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
۳) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
۴) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۵) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۶) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه نمایید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده، (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.
۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها ریخته و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

1. http://www.samantajhiz.com/Support.aspx

ISO13485 KGS

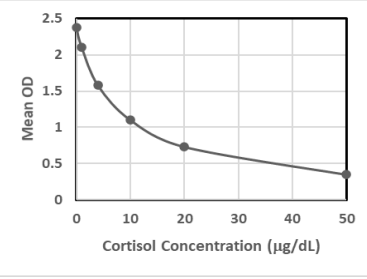
توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به‌دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

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

۹) مقدار جذب را برای هر چاهک در طول‌موج 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؛ اما در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به‌عنوان مثال0.01 µg/dL) در نظر بگیرید.

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (µg/dL)
Cal. A	A1	2.293	2.380	0
	B1	2.467		
Cal. B	C1	2.033	2.104	1
	D1	2.175		
Cal. C	E1	1.536	1.579	4
	F1	1.622		
Cal. D	G1	1.074	1.102	10
	H1	1.130		
Cal. E	A2	0.719	0.732	20
	B2	0.745		
Cal. F	C2	0.341	0.350	50
	D2	0.359		



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 درون‌دور 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 (µg/dL)	3.98	8.77	19.1
SD (µg/dL)	0.24	0.47	0.95
CV (%)	6	5.3	5

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

دقت بین‌دور 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)	4.53	9.51	21.1
S.D (µg/dL)	0.28	0.54	1.12
C.V (%)	6.2	5.6	5.3

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به‌عنوان 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	3.8	11.4	7.6	7.88	103.7
2	6.2	14.9	10.55	10.25	97.1
3	12.6	23.2	17.9	18.2	101.7

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	8.2	3.8	-2.5	2.3	-1.1
2	12.6	3.2	2.8	1.9	-0.8
3	24.1	2.6	-2.6	-2.2	1.3

۵) 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 ۰/۴ µg/dL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645\ SDs$$
$$LOB = Meanb + 1.645\ SDb$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۶) 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 ۱۰۰±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

۷) بررسی پایداری(Stability)

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

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 به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
OBL	Own brand Labeling
Σ	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1.Carpo L. Cushing syndrome: A review of diagnostic test. *Metabolism*. 25, 955-977 (1979).
2.Wilson JD, Foster DW. (Editors) Williams Textbook of endocrinology. 7th ED WB Saunders
3. Watts NB, Tindall GT. Rapid assessment of corticotropin reserve after pituitary surgery. JAMA, 259, 708. (1988).
4.Burtis CA, Ashwed ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed, WB Saunders, Philadelphia. 1825-27 (1994).

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

www.samantajhiz.com

تهران- بزرگراه آبشناسان- سردارجنگل شمالی- خیابان پنج تن- بلوار قدس- کوچه دوم شرقی- پلاک ۸

تلفن : ۰۲۱۸۵۵۱۸۰۰۰