

اهمیت بالینی

کورتیزول از گروه هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی با ساختار استروئیدی می‌باشد که در شرایط استرس، فعالیت‌های بدنی و یا هیپوگلیسمی، از تبدیل کلسترول به پرگنولون، تولید می‌شود. ترشح کورتیزول یک ریتم شبانه روزی مرتبط با ACTH دارد و بیشترین مقدار آن در صبح زود می‌باشد. این هورمون با افزایش گلوکونئوز در کبد و افزایش مقاومت به انسولین در بافت‌های عضله اسکلتی و چربی، باعث افزایش قند خون و ذخیره گلیکوژن در کبد می‌شود. افزایش مقدار کورتیزول در سندرم کوشینگ، چاقی، بارداری و هیپرتیروئیدی و بیماران مبتلا به برخی تومورهای آدرنال و تومورهای مترشحه ACTH اکتوپیک دیده می‌شود. کاهش کورتیزول خون در بیماری‌هایی نظیر آدیسون، هیپوپلازی مادرزادی قشر آدرنال، هیپوپیتوئیتاریسم، هایپوتیروئیدی و بیماری‌های کبدی مشاهده شده است. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری میزان کورتیزول در سرم یا پلاسمای انسان می‌باشد.

اصول آزمایش

این تست براساس الایزای رقابتی طراحی شده است. با اضافه شدن نمونه‌های حاوی آنتی‌ژن آزاد، آنتی‌ژن کونژوگ شده با آنزیم HRP و سپس آنتی‌بادی بیوتینیل به چاهک‌های حاوی استرپتاویدین تثبیت شده، کمپلکس‌های ایمنی از طریق واکنش بیوتین با استرپتاویدین، به کف چاهک متصل می‌شوند. پس از انجام شستشو و افزودن محلول سوبسترای آنزیم HRP به چاهک‌ها، رنگ آبی ایجاد می‌شود که با افزودن محلول متوقف‌کننده تبدیل به رنگ زرد می‌گردد. محصول نهایی تولید شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین جذب نوری را دارد. شدت رنگ

بوجود آمده با غلظت کورتیزول نمونه و کالیبراتورها، نسبت معکوس دارد. در نهایت، غلظت کورتیزول موجود در نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت

۱) کالیبراتورها (Calibrators) ۰/۷۵ میلی‌لیتر:

شامل شش ویال با غلظت‌های ۰، ۰۴، ۱، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ µg/dL تهیه شده از سرم انسان.

۲) محلول کونژوگ آنزیمی (Cortisol Enzyme Conjugate) ۶ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP.

۳) محلول کونژوگ بیوتینی (Cortisol Biotin Conjugate) ۶ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل محلول آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر.

۴) پلیت ۹۶ تستی:

یک پلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت‌شده که به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی بسته‌بندی شده است.

۵) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی‌لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

۶) محلول سوبسترا A (Substrate A) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

۷) محلول سوبسترا B (Substrate B) ۶/۵ میلی‌لیتر:

یک ویال محلول هیدروژن پراکساید (H2O2).

۸) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی‌لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف‌کننده واکنش.

۹) سرم کنترل (Cortisol Control):

ویال(های) حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم کنترل.

۱۰) برچسب مخصوص پلیت:

یک ورق.

توجه ۱: کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. محلول متوقف‌کننده را می‌توان در دمای اتاق نگهداری کرد.

توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه 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.

موارد احتیاط در استفاده از کیت

• این کیت برای انجام تست‌های تشخیصی در محیط‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشا سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBSAg و آنتی‌بادی‌های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده‌اند، اما از آنجا که هیچ روشی به‌طور صددرصد نمی‌تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت‌های لازم به عمل آورده شود.

• محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری‌ساخت‌ها خودداری فرمایید.

• برای دریافت نتایج بهتر و دقیق‌تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک‌ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه ای باشد که منجر به اثر دررفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول‌ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.

• شستشوی نامناسب می‌تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.

• کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است خودداری نمایید.

جمع آوری و تهیه نمونه‌ها

• نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم یا پلاسمای هپارینه انسانی می‌باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا می‌گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

• نگهداری سرم باید در لوله‌های در بسته انجام شود. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری می‌باشد و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی‌تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

• 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.

آماده سازی محلول‌ها

محلول شستشو: کل حجم ویال محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

محلول آماده شده 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 کنید.

محلول سوبسترا: محلول‌های سوبسترای A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترای A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول سوبسترا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول سوبسترا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه ویال‌های کالیبراتور، کنترل و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی مانده به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل و یا نمونه‌های بیمار را در داخل چاهک‌های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می‌شود از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود و از میانگین جذب نوری آنها استفاده شود.

۳) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگ آنزیمی به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را ۳۰-۲۰ ثانیه به‌آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۴) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگ بیوتینی به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را ۳۰-۲۰ ثانیه به‌آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۴) پلیت را با برچسب مخصوص بیوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی یا وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

۶) چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌منظور تخلیه کامل مایعات، پلیت را به‌آرامی بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

No.	Sample (µg/dL)	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
		% Bias				
1	5.6	1.6	-1.9	-2.2	-3.7	-3.6
2	17.1	2.4	2.1	-3.1	-2.3	-2.2
3	23.6	3.3	-0.8	1.3	-1.9	-2.8

Cross Reactivity

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز کورتیزول مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد.

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

Sensitivity

براساس جمع میانگین جذب کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت $0.4 \mu\text{g/dL}$ می‌باشد.

منابع

- 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 با بخش پشتیبانی شرکت

تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

مقادیر مورد انتظار

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه مصرف کننده 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

Intra – Assay

دقت درون‌تستی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean Cortisol (µg/dL)	4.45	18.51	27.19
SD (µg/dL)	0.24	0.89	1.12
CV (%)	5.4	4.8	4.1

Inter – Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی نتایج حاصل از سه نمونه سرمی با غلظت‌های متفاوت در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean Cortisol (µg/dL)	1.98	11.85	24.11
SD (µg/dL)	0.12	0.68	1.22
CV (%)	6	5.7	5.1

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به‌نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شده و به‌عنوان یک نمونه، مقدار کورتیزول در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

No.	Sample (µg/dL)	Added (µg/dL)	Exp. (µg/dL)	Obs. (µg/dL)	% Rec
1	3.6	11.1	7.3	7.8	106.8
2	18.2	22.3	20.25	20.7	102.2
3	25.4	3.2	14.3	14.2	99.3

Linearity

در این تست، غلظت کورتیزول در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

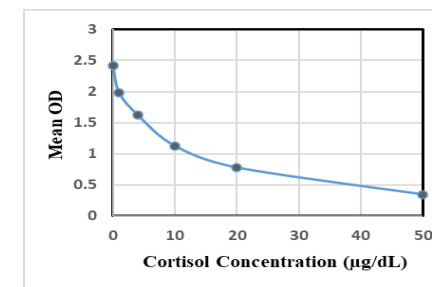
(۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای آماده شده (به بخش آماده‌سازی محلول‌ها مراجعه شود) به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بپوشانید. سپس پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

توجه: اگر بیشترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول سوبسترا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

(۸) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید.

(۹) جذب نوری چاهک‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر در زمان کمتر از ۱۵ دقیقه بخوانید. از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ استفاده نمایید. محاسبه غلظت به روش Point to Point و 4PL قابل اجرا است؛ در صورت استفاده از روش 4PL غلظت کالیبراتور A را عددی کوچک (به‌عنوان مثال $0.01 \mu\text{g/dL}$) در نظر بگیرید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (µg/dL)
Cal. A	A1	2.401	2.421	0
	B1	2.441		
Cal. B	C1	1.922	1.997	1
	D1	2.072		
Cal. C	E1	1.613	1.624	4
	F1	1.635		
Cal. D	G1	1.095	1.127	10
	H1	1.159		
Cal. E	A2	0.755	0.781	20
	B2	0.807		
Cal. F	C2	0.319	0.349	50
	D2	0.379		



نکته: جذب نوری به‌دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی فوق فقط به‌عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.