اندازه‌گیری هورمون کورتیزول در سرم انسان

Cortisol ELISA Kit 96t Cat. NO: 2924-96
(Brochure Rev: 18 (1399/04/15)

مقدمه:

کورتیزول یا هیدروکورتیزون، یک هورمون استروئیدی ۲۱ کربنه می‌باشد که به عنوان قویترین گلوکوکورتیکوئید 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 تاثیر روی واکنش تبدیل کلسترول به پرگنولون، موجب افزایش سنتز و ترشح کورتیزول می‌شود و کورتیزول نیز به صورت پس‌نورد، CRH و ACTH را مهار می‌کند. ترشح کورتیزول یک ریتم شبانه روزی مرتبط با ACTH دارد و بیشترین مقدار آن در صبح زود می‌باشد.

در پلاسما قسمت اعظم کورتیزول به پروتئینی به نام گلوبولین متصل شونده به کورتیکواستروئید (CBG) و با تمایل کمتر به آلبومین متصل می‌شود. مقداری از کورتیزول نیز به صورت آزاد، فرم فعال این هورمون می‌باشد که از طریق ادرار دفع می‌شود و در ادرار ۲۴ ساعته قابل اندازه‌گیری است.

اثرات کورتیزول در بدن متنوع می‌باشد و مهمترین آنها شامل تغییر فرایندهای متابولیک و تنظیم پاسخ‌های ایمنی است. کورتیزول با افزایش گلوکونئوژنز در کبد و افزایش مقاومت به انسولین در بافت‌های عضله اسکلتی و چربی، باعث افزایش قند خون و ذخیره گلیکوژن در کبد می‌شود. افزایش سطح کورتیزول خون باعث افزایش کاتابولیسم پروتئین‌ها و در نتیجه میوپاتی می‌شود. همچنین کاتابولیسم پروتئین‌ها باعث نازکی پوست و از دست رفتن قدرت بافت پیوندی می‌گردد. به علاوه کورتیزول موجب توزیع نا متقارن بافت چربی در اطراف شکم، گردن و صورت می‌شود.

افزایش مقدار کورتیزول در سندرم کوشینگ، چاقی، بارداری و هیپرتیروئیدی دیده می‌شود. این حالت در بیماران مبتلا به برخی تومورهای آدرنال و تومورهای مترشحه ACTH اکتوپیک نیز گزارش شده است. کاهش کورتیزول خون در بیماری‌هایی نظیر آدیسون، هیپوپلازی مادرزادی قشر آدرنال، هایپوپیتوئیتاریسم، هایپوتیروئیدی و بیماری‌های کبدی مشاهده شده است.

اصول آزمایش:

سنجش ایمنی آنزیمی رقابتی (Type 7):

در این تست، از واکنش بین استرپتاویدین (Streptavidin) و بیوتین جهت اتصال و بی‌حرکت کردن آنتی‌بادی ضد کورتیزول به سطح پلیت استفاده شده است. نمونه‌های سرم و کالیبراتورها که حاوی کورتیزول آزاد و غیر کونژوگه هستند به همراه کورتیزول کونژوگه با آنزیم HRP در چاهک‌ها ریخته می‌شوند. رقابت بین دو آنتی‌ژن برای اتصال به آنتی‌بادی ضد کورتیزول بیوتینیله شده که به استرپتاویدین کف پلیت متصل شده است، باعث می‌شود، هرچه مقدار کورتیزول نمونه بیشتر باشد، کورتیزول کونژوگه کمتری به آنتی‌بادی متصل شود. پس از تخلیه و شستشوی چاهک‌ها، محلول رنگزا اضافه می‌شود که منجر به تشکیل محصول آبی رنگ می‌شود و با افزودن محلول متوقف کننده به رنگ زرد تغییر رنگ می‌دهد. این محصول در طول موج ۴۵۰ نانومتر، بیشترین میزان جذب 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 (نمودار کالیبراتورها) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱. میکرو پلیت Coat شده با استرپتاویدین ۹۶ تستی بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.
۲. کالیبراتورهای کورتیزول در مقادیر ۰، ۱، ۴، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ µg/dl. تهیه شده در سرم انسان.
۳. کونژوگه آنزیمی کورتیزول: ۱ ویال ۶ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌ژن متصل به آنزیم HRP در بافر است.
۴. کونژوگه بیوتینی کورتیزول: ۱ ویال ۶ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌بادی ضد کورتیزول متصل به بیوتین در بافر است.
۵. محلول شستشو (۵۰x) : ۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۶. محلول رنگزا A: ۱ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷. محلول رنگزا B: ۱ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸. محلول متوقف کننده واکنش: ۱ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۹. بر چسب مخصوص پلیت.

توجه : کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱. محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جدا خودداری نمایید.
۲. کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آنها گذشته است، استفاده ننمایید.
۳. توجه فرمایید محلول‌ها در مجاورت نور و گرما قرار نگیرند.
۴. محتویات این کیت با منبع انسانی از نظر منفی بود HIV1/2 ، HBsAg و HCV تست شده‌اند. ولی هیچ روشی به طور کامل قادر به مشخص کردن منفی بودن موارد فوق نیست. بنابراین لازم است به صورت بالقوه آلوده در نظر گرفته شود و کار با آنها طبق دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.
۵. استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است
۶. در هنگام کار با کیت دقت فرمائید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن نپاشد و از تماس با دهان و سایر مخاط جدا خودداری گردد.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شده و به سرعت سرم از سلول‌های خونی جدا گردد. از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری نمائید. نمونه‌های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.
۲. درب ظروف نمونه باید کاملا بسته باشد و تا ۵ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی‌تر حداکثر تا ۲ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

آماده‌سازی معرف‌ها:

محلول شستشو: کل محتویات ویال محلول شستشو (۵۰x) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید.

محلول رنگزا: ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را با ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B مخلوط نمایید. محلول فوق بعد از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می‌باشد.

توجه: در صورت مشاهده رنگ آبی در محلول رنگزا و یا کدورت و رشد باکتری، از این محلول استفاده نشود.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که کلیه محلول‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمائید.

۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمایی ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهدارید.

۲. ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها و نمونه‌ها در چاهک-های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت (Duplicate) در چاهک‌ها ریخته شود.

توجه: حتماً چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.

۳. ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate) به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴. ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی (Biotin Conjugate) 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 به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۶. محتویات پلیت را با وارونه کردن تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

۷. ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکتن دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

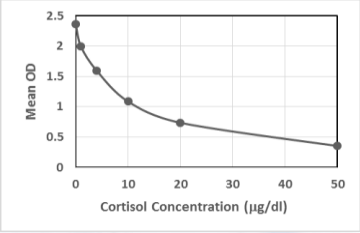
توجه: اگر بالاترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۸. ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۹. مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید.

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	1.996	1
	D1	1.070		
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		



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای کورتیزول

	صبح	عصر
بالغ	۵-۲۳ µg/dl	۳-۱۳ µg/dl
کودک	۳-۲۱ µg/dl	۳-۱۰ µg/dl
نوزاد	۱-۲٤ µg/dl	-

پارامترهای کنترل کیفی

Intra - Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری سه نمونه سرم در یک نوبت تست انجام گردید.

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)	0.15	0.52	1.12
C.V (%)	4.6	3.5	5

Inter - Assay

ارزیابی دقت بین‌تستی با سه نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام پذیرفت

Serum sample	1	2	3
No.of Repeats	15	15	15
Mean Cortisol (µg/dl)	2.4	12.65	18.64
S.D (µg/dl)	0.14	0.74	0.98
C.V (%)	5.8	5.8	5.2

Recovery

در این تست دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، غلظت کورتیزول در آن اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample (µg/dl)	Added (µg/dl)	Exp. (µg/dl)	Obs. (µg/dl)	Rec. (%)
1	3.5	12.3	7.9	8	101
2	5.4	16.7	11.05	10.8	97.5
3	13.5	19.8	16.7	17	102
4	2.8	14.9	8.85	8.6	97.2

Linearity

در این تست غلظت کورتیزول در رقت‌های مختلف نمونه سرم جهت تعیین خطی بودن کیت، اندازه‌گیری شد.

NO.	Sample	1/2	1/4	1/8	1/16
		Recovery %			
1	7.9	100.3	102	98.1	97
2	14.6	99.1	99	98	98.2
3	21.7	102	98.4	97.8	99.4
4	9.7	98	96.4	98.6	97.4

Specificity

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

بر اساس جمع میانگین جذب نوری کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت ۰/۴ µg/dl می‌باشد.

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 Philadelphia. (1985).
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.idealdiag.com
تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۱۵
تلفن: ۲۳-۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹