

کیت اندازه گیری AMH در سرم انسان
AMH ELISA Kit 96t
Cat. No: 6824-96 / Rev: F5 (1405/07/26)

مقدمه:

هورمون آنتی مولرین (AMH) یک گلیکوپروتئین هوموایم با جرم مولکولی تقریبی ۱۴۰ کیلودالتون است که توسط گنادها ترشح می شود. سطح AMH در سرم خانمها به عنوان شاخص طول عمر باروری فرد شناخته شده است و اندازه گیری آن در بررسی علل ناباروری، اختلالات قاعدگی و یائسگی زودرس اهمیت دارد. همچنین، مقادیر بالای AMH (>4.7 ng/mL) در خانمها یکی از شاخصهای سندرم تخمدان پلی کیستیک است. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی سطح هورمون AMH در نمونه سرم یا پلاسمای انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این تست بر اساس الایزا ساندویچ طراحی شده است. در این روش بی حرکت سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی بادی مونوکلونال بیوتینیل شده ضد AMH صورت می گیرد. با مخلوط شدن آنتی بادی بیوتینیل، آنتی بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی ژن، واکنش بین آنتی بادیها و آنتی ژن بدون هیچ رقابتی صورت می گیرد و کمپلکس ساندویچ محلول ایجاد می گردد. به موازات واکنش فوق، کمپلکس ایمنی به دلیل تمایل بسیار بالای بین استرپتاویدین و بیوتین، به سطح چاهک متصل می شود. پس از شستشوی چاهکها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوپسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری، با غلظت AMH سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت AMH سرم به کمک منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتورها (AMH Cal A-F). شش ویال با غلظت های ۰، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۵ ng/mL، تهیه شده از سرم انسان.
کالیبراتورهای این کیت، با استفاده از AMH خالص تهیه شده اند. درجه خلوص AMH توسط تکنیکهای طیفسنجی جرمی و مادون قرمز بررسی و تأیید شده است.

۳) محلول کونژوگه آنزیمی (AMH Enzyme Conjugate). یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی ضد AMH متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): یک ویال ۰/۵ میلی لیتری.
۵) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک ویال ۰/۵ میلی لیتری.
۶) محلول شستشو (Wash Solution-20X): یک ویال ۵۰ میلی لیتری.
۷) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
۸) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
۱۰) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
توجه ۱: تمام محلولها 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 گردیده 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 شماره های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
۲) تمام محلولها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلولهایی که تاریخ انقضاء آنها گذشته است استفاده نشود.

۳) توجه فرمایید که محلولها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماریزا با استفاده از روشهای متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به 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 و 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 به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:

۱) برای این آزمایش از نمونه های سرم یا پلاسمای انسان استفاده کنید. 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 سلولهای خونی جدا گردد. حتی الامکان از نمونه های اپتیک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.
۲) درب ظرف نمونهها باید کاملاً بسته باشد. نمونهها تا ۷ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونهها خودداری نمایید.

آماده سازی و نگهداری معرفها:

۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۵۰ میلی لیتر از محلول شستشو (20X) را به ۹۵۰ 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 نمایید.
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 نمونهها به دمای اتاق (۲۸-۲۲ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، کنترلها و نمونهها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهکهای مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهکها را همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید.
۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترلها و نمونهها در چاهکهای مورد نظر بریزید. بهتر است از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهکها ریخته شود.
۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به تمام چاهکها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۴) چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت ببشویید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
۵) محتویات پلیت را تخلیه کرده و چاهکها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده، (بخش آماده سازی معرفها 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 چاهکها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.
۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده سازی معرفها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهکها بریزید و پلیت را به مدت ۲۰ 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، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

۷) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش به کلیه چاهکها اضافه کنید. پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.
۸) جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه گیری کنید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه ارائه شده است.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می دهد که کیت مورد نظر در زمان های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در این آزمایش های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برجسب 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:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. 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 تلفن های مندرج بر روی جعبه بخش پشتیبانی تماس بگیرید.

توجه: چنانچه از دستگاه های ایلازا پروسسور استفاده می کنید، می توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آشناسان - سردار جنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸ کارخانه: کرج - کمال شهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۱
تلفن: ۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹-۲۳

۶) بررسی تداخلات (Interference)

بر اساس فرمول زیر، درصد تداخلات رایج در سنجش AMH مورد ارزیابی قرار گرفت:

$$100 \times \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر}} = \text{درصد تداخل}$$

بر اساس نتایج به دست آمده هموگلوپین تا ۵۰۰، بیلی روبین تا ۳۰ و تری گلیسرید تا ۵۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارد.

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

واکنش متقاطع ترکیبات مشابه با AMH توسط اضافه کردن غلظت های مختلفی از این ترکیبات به سرم و اندازه گیری نسبت بین مقدار ماده مداخله گر به مقدار AMH مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، سنجش شد. نتایج این بررسی نشان می دهد که این ترکیبات با آنتی بادی AMH واکنش متقاطع ندارند. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده $100 \pm 10\%$ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

Substances	Concentration	Cross Reactivity
FSH	100 mIU/mL	< 0.001
hCG	1000 mIU/mL	< 0.001
LH	200 mIU/mL	< 0.001
PRL	100 ng/mL	< 0.001

۸) 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 $0.37 \text{ ng/mL} \pm 0.01$ تعیین گردید.

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s \\ \text{LOB} &= \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b \\ (\text{s: Diluted sample \& b: Blank}) \end{aligned}$$

۹) بررسی پایداری (Stability)

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

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد.

Sample/ Control	1	2	3	Ctrl. 1	Ctrl. 2	Ctrl. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (ng/mL)	1.97	4.13	11.48	5.11	3.21	4.1
SD (ng/mL)	0.09	0.17	0.47	0.23	0.14	0.17
CV (%)	4.6	4.1	4.1	4.5	4.4	4.1

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین دور (Between-Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت های متفاوت و سه سطح کنترل در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.

Sample/ Control	1	2	3	Ctrl. 1	Ctrl. 2	Ctrl. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (ng/mL)	1.64	8.58	11.24	5.15	3.28	4.06
SD (ng/mL)	0.09	0.43	0.49	0.27	0.15	0.18
CV (%)	5.5	5	4.4	5.2	4.6	4.4

۳) بررسی درستی-آزمون بازایی (Recovery)

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، غلظت AMH در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش، $\text{Bias} < 10\%$ نسبت به نتایج مورد انتظار است.

No.	Sample (ng/mL)	Added (ng/mL)	Exp. (ng/mL)	Obs. (ng/mL)	% Rec.
1	5.51	2.11	3.81	3.91	102.6
2	2.31	13.55	7.93	7.77	97.9
3	10.35	2.11	6.23	6.35	101.9

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت AMH در رقت های مختلف نمونه سرم جهت تعیین خطی بودن کیت اندازه گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

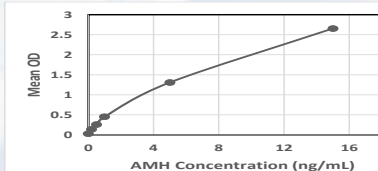
No.	Sample (ng/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	1.31	2.3	-1.4	0.9	1.7
2	4.32	2.7	2.2	-1.6	-2.8
3	8.13	1.5	2.1	1.3	2.2

۵) بررسی درستی-مقایسه روش ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان AMH در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، 0.998 محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \leq \text{Pearson Correlation Coefficient} \leq 1.0$$

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (ng/mL)
Cal. A	A1	0.027	0.028	0
	B1	0.029		
Cal. B	C1	0.136	0.140	0.2
	D1	0.144		
Cal. C	E1	0.253	0.258	0.5
	F1	0.263		
Cal. D	G1	0.451	0.454	1
	H1	0.457		
Cal. E	A2	1.301	1.308	5
	B2	1.315		
Cal. F	C2	2.638	2.655	15
	D2	2.672		



در صورت نیاز به گزارش غلظت های بالاتر از 15 ng/mL رقیق سازی با نمونه ای با غلظت نزدیک به 0 ng/mL انجام گردد.

[مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای AMH]

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

Normal Range (ng/mL)	
Males	
< 2 years	18 – 283
2 - 12 years	9 – 110
> 12 years	< 13
Females	
< 3 years	0.1 – 4.5
3 – 19 years	0.2 – 7.9
20 - 29 years	0.85 – 12
30 - 34 years	0.55 – 8.1
35 - 39 years	0.1 – 7.7
40 - 44 years	0.03 – 5.6
45 - 50 years	< 2.6
51 - 55 years	< 0.9
> 55 years	< 0.03

[پارامترهای کنترل کیفی]

۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون دور (Within-Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت های متفاوت و سه سطح کنترل در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش $CV < 10\%$ است.