

کیت اندازه‌گیری AMH در سرم انسان
AMH ELISA Kit 96t
 Cat. No: 6824-96 / Rev: D3 (1403/03/22)

مقدمه:

هورمون آنتی مولرین (AMH) یک گلیکوپروتئین هومودایمر با جرم مولکولی تقریبی ۱۴۰ کیلودالتون است که توسط گنادها ترشح می‌شود. سطح AMH در سرم خانم‌ها به‌عنوان شاخص طول عمر باروری فرد شناخته شده است و اندازه‌گیری 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 پلی‌کیستیک است. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح هورمون AMH در نمونه سرم یا پلاسمای انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این تست بر اساس الایزای ساندویچ طراحی شده است. در این روش بی‌حرکت‌سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین استریناوبیدین تثبیت شده در سطح چاهک و آنتی‌بادی مونوکلونال بیوتینیله ضد AMH صورت می‌گیرد. با مخلوط شدن آنتی‌بادی بیوتینیله، آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP و سرم حاوی آنتی‌ژن، واکنش بین آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس ساندویچ محلول ایجاد می‌گردد. به موازات واکنش فوق، کمپلکس ایمنی به دلیل تمایل بسیار بالای بین استریناوبیدین و بیوتین، به سطح چاهک متصل می‌شود. پس از شستشوی چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوپسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود 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 می‌گردد.

محتویات کیت:

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استریناوبیدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورها (AMH Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های 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 شده‌اند. 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 میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد AMH متصل به آنزیم HRP در بافر.
 - ۴) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۵) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
 - ۶) محلول شستشو (Wash Solution-20X): یک ویال ۵۰ میلی‌لیتری.
 - ۷) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
 - ۸) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
 - ۹) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
 - ۱۰) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.
- توجه: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری 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) 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 HIV/1، HBSAg و HCV بررسی شده‌اند؛ 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 بیمار، 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، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

- ۱) برای این آزمایش از نمونه‌های سرم استفاده کنید. 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) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۷ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

- ۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۵۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (20X) را به ۹۵۰ 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 (۲۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش 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 کنید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به‌مدت 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 آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور 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 آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

۷) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی 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 اندازه‌گیری کنید (از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه ارائه شده است.

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 قرار داده شد 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 این آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب 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 تلفن‌های مندرج بر روی جعبه بخش پشتیبانی تماس بگیرید.

معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

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

۶ بررسی تداخلات (Interference)

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

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

بر اساس نتایج به دست آمده همگلوبین تا ۵۰۰، بیلی‌روبین تا ۳۰ و تری‌گلیسرید تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تأثیری بر نتیجه سنسج ندارد.

۷ بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

واکنش متقاطع ترکیبات مشابه با AMH توسط اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از این ترکیبات به سرم و اندازه‌گیری نسبت بین مقدار ماده مداخله‌گر به مقدار AMH مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب، سنسج شد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که این ترکیبات با آنتی‌بادی AMH واکنش متقاطع ندارند. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده ۱۰±۱ 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 ۰/۰۳۷ ng/mL تعیین گردید.

$$\text{LOD} = \text{LOB} + 1.645 \text{ SD}_s$$

$$\text{LOB} = \text{Mean}_b + 1.645 \text{ SD}_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۹ بررسی پایداری (Stability)

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

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 غلظت‌های 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 بازیابی (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 سنسج 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)

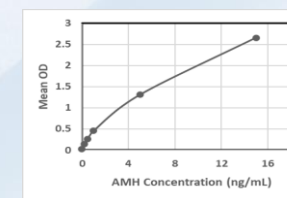
در این تست غلظت AMH در رقت‌های مختلف نمونه سرم جهت تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش $\text{Bias} < 10\%$ است.

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 روش‌ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان AMH در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۸ محاسبه گردید.

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		



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	
<24 months	14 - 466
2 - 12 years	7.4 - 243
>12 years	0.7 - 19
Females	
<24 months	<4.7
2 - 12 years	<8.8
13 - 19 years	0.9 - 9.5
20 - 29 years	1.77 - 12.41
30 - 39 years	0.11 - 12.67
40 - 49 years	0.05 - 9.77

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 غلظت‌های 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.