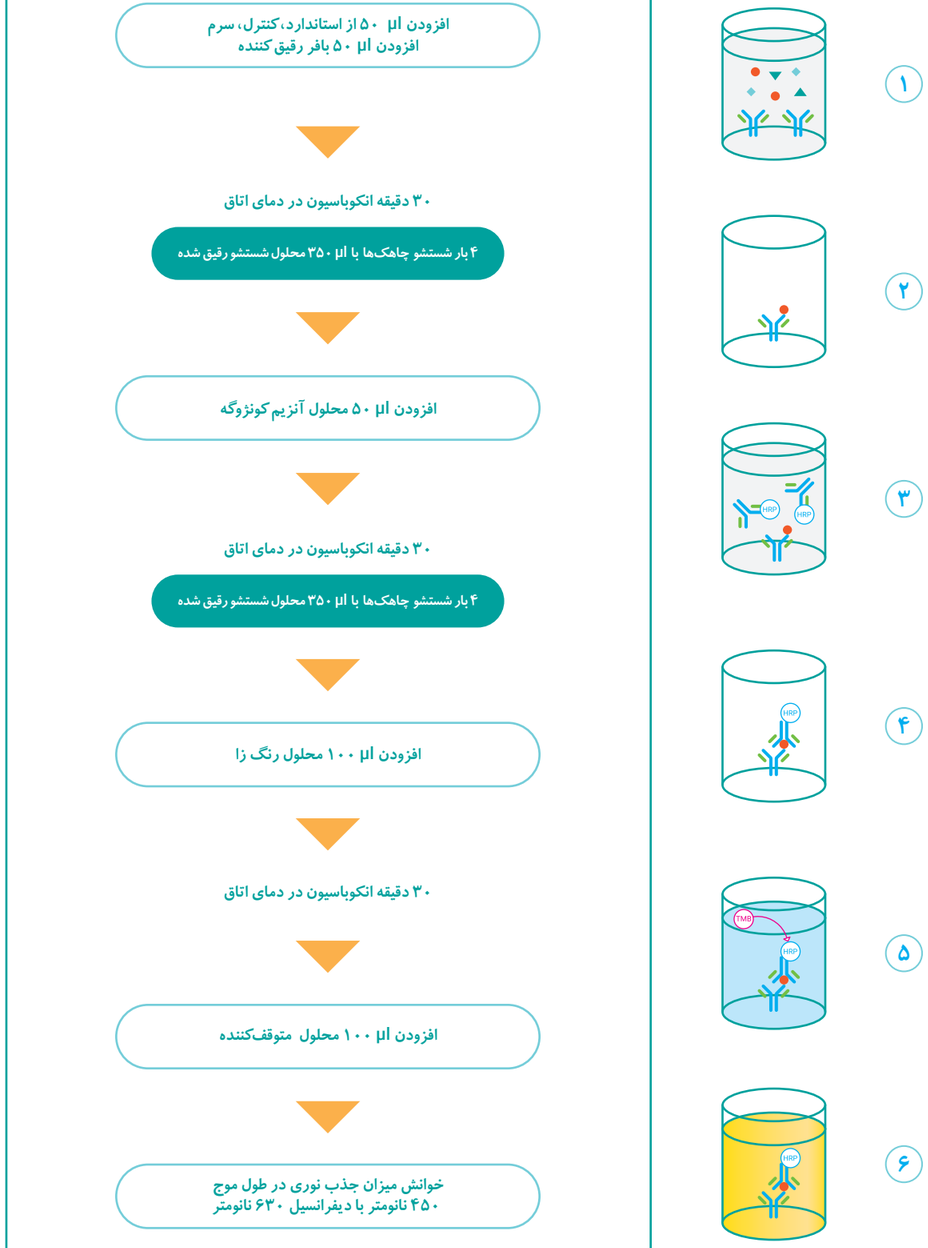
خلاصه روش کار



Key: TMB TMB | HRP HRP | AMH | Antibody

کاربرد

اندازه‌گیری غلظت Anti-Müllerian hormone **در سرم یا پلاسمای انسانی به روش ایمونوآنزیماتیک** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
(Cat.No. DG.AMH.01)

مقدمه

ساختار و نقش فیزیولوژیک:

هورمون مهارکننده مولرین Anti-Müllerian hormone (AMH) گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۱۴۰ کیلودالتون، عضوی از خانواده فاکتورهای رشد تغییردهنده β یا Transforming growth factor β (TGF-β) است.[۱] در مردان این هورمون دایمریک از سلولهای سرتولی بیضه و در زنان توسط سلولهای گرانولوزای فولیکول های آنترال و پره آنترال تولید می شود.[۲و۳]

AMH در طی تکامل جنین مذکر ضمن رشد اندامهای جنسی مردانه مانع از تبدیل لوله های مولرین به رحم و سایر اندامهای جنسی زنانه می گردد. سطح غلظت سرمی این هورمون در نوزادان پسر بالا بوده و پس از ۲ سالگی به تدریج کاهش می یابد. در سن بلوغ غلظت سرمی آن به حداقل می رسد.

در جنین مونث، فقدان AMH سبب تشکیل اندامهای جنسی مونث می گردد. در سن بلوغ این هورمون باعث مهار شروع به رشدو تکامل فولیکولهای پره آنترال تحت القای FSH می شود.[۴] با این حال در هر سیکل ماهانه یک فولیکول که حاوی رسپتورهای FSH بیشتری باشد به تکامل نهایی رسیده و تخمک آزاد می شود.[۵] غلظت سرمی AMH در بدو تولد دختران پایین بوده و در دوران بلوغ افزایش می یابد. در دوران پیش از یائسگی باتوجه به کاهش یا فقدان فولیکولهای تخمدان غلظت AMH به حداقل می رسد.[۶]

کاربرد بالینی:

اندازه گیری AMH در ارزیابی تعداد تخمک ها یا فولیکولهای باقیمانده در تخمدان کاربرد دارد.[۷و۸] علاوه بر آن اندازه گیری غلظت سرمی این هورمون می تواند در ارزیابی سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)، پایش درمان سرطان تخمدان، بررسی ناهنجاری های جنسی جنین و وجود دستگاه تناسلی مبهم، پیش بینی شروع یائسگی و ارزیابی فعالیت بیضه در نوزادان پسر کمک کننده باشد.[۹و۱۰]

اساس روش سنجش

مدت زمان انجام تست: ۳۰ دقیقه + ۳۰ دقیقه + ۳۰ دقیقه

طراحی کیت AMH بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک ساندویچی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلنال می‌باشد. در این روش آنتی‌ژن مورد سنجش طی دو مرحله بین آنتی‌بادی تثبیت شده در ته چاهک‌های پلی‌استایرنی و آنتی‌بادی دوم متصل به آنزیم پراکسیداز (HRP) که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را روی مولکول AMH شناسایی می‌کنند، قرار می‌گیرد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیت‌های غیرمتصل با افزودن سوبسترا، تترا متیل بنزیدین (TMB)، آنزیم رنگ آبی ایجاد می کند. با اضافه نمودن محلول متوقف‌کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت AMH ارتباط مستقیم دارد، در طول موج **۴۵۰** نانومتر (با دیفرانسیل **۶۳۰** نانومتر) اندازه‌گیری می گردد.

توجه و احتیاط

- این کیت تشخیصی به صورت *in vitro* قابل استفاده می‌باشد.
- کلیه محلول‌های کیت آماده مصرف هستند، فقط محلول شستشوی غلیظ **(20x)** قبل از استفاده نیاز به رقیق‌سازی دارد.
- اجزای اختصاصی این کیت برای مصرف با اجزای هم سری ساخت کیت ارائه شده‌اند.
- اجزای عمومی کیت شامل محلول‌های شستشو، رنگ زا و متوقف‌کننده می‌باشند که برای سایر محصولات دیازیست نیز قابل استفاده هستند.

به‌منظور رقیق‌سازی نمونه می‌بایست از "محلول استاندارد صفر" کیت مربوطه، استفاده گردد.

- جهت کاهش پدیده تأخیری، ضرورت دارد زمان انجام مرحله اول تست در کمتر از **۱۰** دقیقه انجام شود.
- توصیه می‌شود در هر تست استانداردها جهت رسم منحنی استفاده شوند، همچنین درصورتی که همزمان بیش از یک پلیت تست گذاشته شود، رسم منحنی برای هر پلیت ضروری است.
- کالیبره بودن ابزارها و دستگاه‌ها در صحت نتایج اثر گذار است.
- جهت ساخت اجزای این کیت از مواد شیمیایی و زیستی استفاده شده است. لذا توصیه می‌شود هنگام کار از تماس مستقیم با مواد پرهیز شود.

محتویات کیت

اجزای تشکیل دهنده کیت ۹۶ تستی AMH به شرح زیر می باشد:

ردیف	نام اجزاء	مقدار/تعداد
۱	پلیت پوشانده شده با آنتی‌بادی مونوکلنال ضد AMH (Anti- AMH Antibody Coated Microtiter Plate)	1/96 wells
۲	استاندارد صفر (Standard A)	1/2 ml
۳	استانداردهای B-F (Standards B-F) برحسب (ng/ml) کالیبراسیون بر مبنای استاندارد WHO IS 16/190 (1st) (ng/ml × 7.14 = pmol/L)	5/1 ml
۴	کنترل پایین و بالا (Controls Low & High) کالیبراسیون بر مبنای استاندارد WHO IS 16/190 (1st)	2/1 ml
۵	بافر رقیق‌کننده (Assay Buffer)	1/6 ml
۶	محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer)	1/25 ml
۷	محلول حاوی آنتی بادی ضد AMH کونژوگه شده (HRP) (Anti-AMH Antibody- HRP Conjugate)	1/6 ml
۸	محلول رنگ زا (TMB Substrate)	1/12 ml
۹	محلول متوقف‌کننده (Stop Solution)	1/12 ml

شرایط نگهداری و پایداری

کیت را در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد نگهداری کنید.

- پایداری کیت در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد، قبل از شروع استفاده **(In Shelf)** و حین استفاده**(In use)** بر مبنای استاندارد CLSI (EP25-A) [۱۱] بررسی گردید که نتایج به شرح زیر می‌باشد:

قبل از شروع استفاده (In Shelf)	تا پایان تاریخ انقضا
حین استفاده (In use)	تا ۶ ماه

جمع آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه مورد نیاز جهت اندازه‌گیری AMH، سرم یا پلاسمای به‌دست آمده با مواد ضد انعقاد هپارین، سیترات سدیم و EDTA می‌باشد. جهت پایداری نمونه‌ها از سدیم ازاید **(Sodium Azide)** استفاده نشود. نمونه ها در دمای **۸-۲** درجه سانتیگراد تا **۱۴** روز و در دمای **۲۰-** درجه سانتیگراد تا شش ماه قابل نگهداری هستند. [۱۲] از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها پرهیز نمایید. جهت اندازه‌گیری AMH نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و بعد با حرکت دست یکنواخت نمایید. در صورتی که غلظت نمونه‌ای بیش از آخرین استاندارد باشد، جهت اندازه‌گیری دقیق آنالیت، ابتدا نمونه را با **"محلول استاندارد صفر"** رقیق و نمونه رقیق شده را مجدد تست کنید. در محاسبه غلظت نهایی این نمونه ها، ضریب رقت را منظور نمایید.

مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند

- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر **۴۵۰** و**۶۳۰** نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای **۱۰۰** و **۵۰** میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یک‌بار مصرف
- آب مقطر برای رقیق سازی محلول شستشوی غلیظ

روش انجام تست

قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق (**۲۵-۲۰** درجه سانتیگراد) برسانید.
- برای تهیه محلول شستشوی قابل مصرف، یک حجم محلول شستشوی غلیظ **(20x)** را با **۱۹** حجم آب مقطر رقیق نمایید.

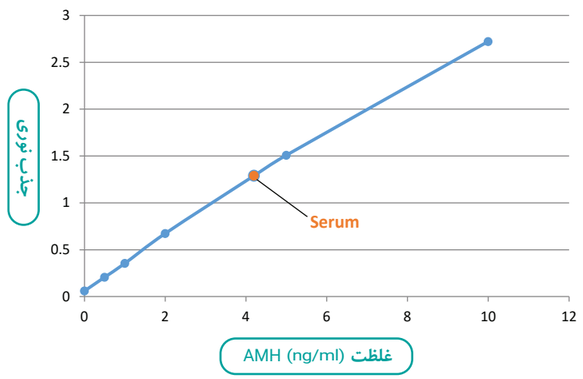
مراحل انجام تست :

۱. ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم به چاهک مربوطه بریزید.
۲. ۵۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را ۱۵ ثانیه تکان دهید.
۳. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۴. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۵. به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه اضافه نمایید.
۶. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۷. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۸. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ زا اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۹. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمایید و بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۵ ثانیه، میزان جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

محاسبه نتایج

غلظت AMH نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به‌صورت دستی یا دستگاه الایزا ریدر) تعیین می‌گردد. در این منحنی جذب نوری استانداردها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را بر حسب ng/ml بر روی محور افقی (X) مشخص کنید و بر اساس آن منحنی را رسم نمایید. با استفاده از منحنی ترسیم شده و جذب نوری بدست آمده از نمونه، غلظت AMH آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

غلظت AMH (ng/ml)	میانگین جذب نوری	جذب نوری	نمونه
۰	۰/۰۶	۰/۰۶	استاندارد A
		۰/۰۶	
۰/۵	۰/۲۱	۰/۲۱	استاندارد B
		۰/۲۱	
۱	۰/۳۶	۰/۳۵	استاندارد C
		۰/۳۶	
۲	۰/۶۷	۰/۶۵	استاندارد D
		۰/۷۰	
۵	۱/۵۱	۱/۵۳	استاندارد E
		۱/۴۹	
۱۰	۲/۷۲	۲/۷۳	استاندارد F
		۲/۷۲	
۰/۵۴	-	۰/۲۲	کنترل پایین
۵/۲۶	-	۱/۵۷	کنترل بالا
۴/۲۰	-	۱/۳۰	سرم



کنترل کیفی

تست در صورتی تأیید می‌گردد که:

- جذب نوری استاندارد صفر کمتر از ۰/۰۹ باشد.
- جذب نوری استاندارد آخر بیش از ۱/۴ باشد.
- خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
- توصیه می‌گردد جهت حصول اطمینان از نتایج کیت، علاوه بر کنترل‌های ارائه شده در کیت، به صورت دوره‌ای از کنترل‌های دقت و صحت تجاری نیز استفاده گردد. بدیهی است نتایج بدست آمده بایستی در محدوده مورد قبول قرائت گردد.

تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- جهت بررسی اختصاصیت آنتی بادی به کار رفته در این کیت، اثر تداخلی آنالیتهای هورمونی Activin A (تا ۱۰۰ ng/ml)، Inhibin A (تا ۱۰۰ ng/ml)، LH (تا ۵۰۰ mIU/ml) و FSH (تا ۵۰۰ mIU/ml) بررسی گردید. نتایج در جدول زیر آمده است:

ماده افزوده شده	درصد تداخل (Cross-reactivity)
Activin A	<۱
Inhibin A	<۱
LH	<۱
FSH	<۱

- اثر تداخلی بیلی روبین (تا ۲۰ mg/dl)، هموگلوبین (تا ۵۰۰ mg/dl)، تری گلیسیرید (تا ۳۰۰۰ mg/dl) و فاکتورهای روماتوئید(تا ۱۰۰۰ IU/ml) در سرم کمتر از ۵٪ می باشد.
- در این کیت برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت (تا ۱۰۰۰ ng/ml) اثر هوک دیده نشد.
- نمونه سرم یا پلاسمای افرادی که سابقه درمان یا تشخیص بیماری با مواد حاوی آنتی‌بادی مونوکلنال موش داشته‌اند، می‌تواند حاوی آنتی بادی‌های انسانی ضد موش (HAMA) باشد. با توجه به غلظت آنتی‌بادی و مواد بازدارنده مورد استفاده در این کیت، واکنش‌های تداخلی غیر اختصاصی به حداقل رسیده و تا کنون واکنش مثبت کاذب مشاهده نشده است.
- محدوده قابل اندازه‌گیری غلظت AMH با این کیت، ng/ml ۱۰-۰/۰۵ می‌باشد.

مقادیر طبیعی

از بررسی تعداد ۳۱۳ نمونه سرم مردان و بانوان سالم و بانوان مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS)، دامنه مقادیر طبیعی برای کیت AMH دیازیست به شرح زیر تعیین گردید:

جنسیت		تعداد	5٪ to 95٪ Interval (ng/ml)	میانه (ng/ml)
مردان		۶۵	۱/۵ -۱۳/۴	۴/۸
زنان	۲۰-۲۹ سال	۵۹	۱/۳-۹/۶	۳/۶
	۳۰-۳۹ سال	۴۱	۰/۷-۷/۶	۲/۴
	۴۰-۵۰ سال	۷۷	۰/۱-۴/۳	۰/۷
زنان با سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)		۷۱	۲/۵-۱۹/۶	۵/۷

قابل ذکر است که جدول فوق یک راهنمای کلی است و توصیه می‌گردد هر آزمایشگاه با اندازه‌گیری غلظت AMH افراد سالم، مقادیر طبیعی مرجع خود را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج استفاده نماید.

ویژگی‌های اختصاصی کیت

۱. حساسیت: حداقل غلظت قابل اندازه گیری AMH که از نمونه فاقد آنالیت قابل تمایز باشد را حساسیت گویند. این مقدار که بر اساس میانگین غلظت استاندارد صفر بعلاوه دو برابر انحراف معیار محاسبه گردیده است (**بدست آمده از ۱۰ تست**)، ng/ml ۰/۰۵ می‌باشد.

۲. صحت: غلظت AMH ۱۷۱ نمونه تصادفی با کیت دیازیست و روش مرجع (ECLIA) اندازه‌گیری شد. نتایج بدست‌آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی (r) ۰/۹۹ را نشان می‌دهد. غلظت نمونه‌ها با کیت دیازیست بین ng/ml ۰/۲۵ تا ۹/۲۳ و با روش مرجع ng/ml ۰/۲۶ تا ۹/۷۲ بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

روش	تعداد نمونه	غلظت نمونه ها (ng/ml)	Intercept	Slope
Passing/Bablok	۱۷۱	۰/۲-۱۰	۰/۱۰۵	۰/۹۵۹
Linear Regression	۱۷۱	۰/۲-۱۰	۰/۱۵۹	۰/۹۲۷

۳. دقت: شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5-A2) [۱۳] ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان AMH ۳ نمونه با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است:.

شماره نمونه	تعداد سنجش	میانگین غلظت (ng/ml)	Within Run		Total	
			SD	٪CV	SD	٪CV
۱	۶۰	۰/۸۵	۰/۰۲	۲/۰۹	۰/۰۲	۲/۶۲
۲	۶۰	۲/۲۰	۰/۱۰	۴/۷۳	۰/۱۰	۴/۷۱
۳	۶۰	۸/۲۲	۰/۱۳	۱/۵۷	۰/۱۵	۱/۷۸

۴. خطی بودن: به منظور بررسی صحت اندازه‌گیری نمونه‌های با غلظت بالای ULoQ (upper limit of quantitation) تست خطی بودن این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34) [۱۴] انجام گردید. بدین منظور نمونه سرم با غلظت ng/ml ۱۰/۲۰ با "نمونه فاقد آنالیت" به صورت متوالی رقیق شد سپس غلظت‌ها با کیت AMH اندازه‌گیری گردید. درصد ریکاوری رقت که شاخص میزان دقت رقت‌گیری می باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)}}{\text{غلظت مورد انتظار (ng/ml)}} \times ۱۰۰$$

(محدوده درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۸/۸ تا ۱۰۰/۸ است)

٪ ریکاوری	غلظت اندازه‌گیری شده (ng/ml)	غلظت مورد انتظار (ng/ml)	رقت
۱۰۰/۸	۵/۱۴	۵/۱۰	۱:۲
۹۹/۰	۲/۵۳	۲/۵۵	۱:۴
۹۹/۴	۱/۲۷	۱/۲۸	۱:۸
۹۸/۸	۰/۶۷	۰/۶۸	۱:۱۶

۵. بازیابی: به منظور بررسی اثر ماتریکس، تست بازیابی این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34) انجام گردید. بدین منظور مقادیر متفاوتی از نمونه حاوی AMH با غلظت بالا (۱۵/۲۰ng/ml) به نمونه مورد بررسی حاوی AMH با غلظت پایین (۰/۹۱ng/ml) افزوده شد. سپس غلظت نمونه‌ها با کیت AMH اندازه‌گیری گردید و درصد ریکاوری که شاخص میزان دقت بازیابی می‌باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{a-b}{c} \times 100$$

a: غلظت اندازه گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن آنالیت
b: غلظت اندازه گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن محلول رقیق‌کننده
c: آنالیت افزوده شده بر حسب ng/ml

(درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۴/۵ تا ۱۰۲/۹ است)

٪ ریکاوری	c (ng/ml)	b (ng/ml)	a (ng/ml)
۱۰۲/۹	۱/۳۷	۱/۳۵	۲/۷۶
۹۵/۶	۲/۵۰	۱/۰۹	۳/۴۸
۹۶/۷	۴/۲۹	۰/۹۰	۵/۰۵
۹۴/۵	۶/۶۸	۰/۷۳	۷/۰۴

منابع

1. Jpling H., *et al*. Paediatric Anti-Müllerian Hormone measurement: Male and female reference intervals established using the automated Beckman Coulter Access AMH assay. Endocrinol Diabetes Metab.1(4):e00021, 2018
2. Hampl R., *et al*. Antimullerian Hormone (AMH) Not Only a Marker for Prediction of Ovarian Reserve. Physiol. Res. 60: 217-223, 2011
3. Matuszczak E., *et al*. Serum AMH inPhysiology and Pathology of Male Gonads. Int J Endocrinol. 128907, 2013
4. DEWAILLY D., *et al*. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. Human Reproduction Update; 20(3):370-85, 2014
5. La Marca, A., Broekmans, F.J. Hum Reprod; 24(9):2264-75, 2009
6. Broer, S.L., *et al*. Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. Human Reproduction Update, 20, 5, 688-701, 2014
7. ARCE JC., *et al*. Ovarian response to recombinant human follicle-stimulating hormone: a randomized, anti-Müllerian hormone-stratified, dose-response trial in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. Fertility and Sterility; 102(6):1633-40, 2014
8. NELSON SM., *et al*. Comparison of antimüllerian hormone levels and antral follicle count as predictor of ovarian response top controlled ovarian stimulation in good-prognosis patients at individual fertility clinics in two multicenter trials. Fertility and Sterility; 103(4):923-30, 2015
9. CHAI J, HOWIE AF. A highly-sensitive anti-Müllerian hormone assay improves analysis of ovarian function following chemotherapy for early breast cancer. European Journal of Cancer; 50(14):2367-74, 2014
10. FONG SL., *et al*. The role of anti-Müllerian hormone in the classification of anovulatory infertility. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology; 186:75-9, 2015
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of *In Vitro* Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition NCCLS Document EP25-A. 2009.
12. Wu AHB. Tietz Clinical Guide To Laboratory Tests. Saunders, Philadelphia 3rd edition, p. 594, 1995
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking – First Edition. EP34. 2018

تهران،خیابان سهروردی شمالی،خیابان افشار جوان،پلاک ۲، واحد ۱۰
تلفن ویژه: ۰۲۱-۷۲۴۵۷
office@garnimed.com
www.garnimed.com

Published: Aug. 2021