

AMH ELISA KIT
کیت کمی تعیین هورمون AMH
 چاهک ۹۶ REF 1062
 IVD

قبل از انجام آزمایش، بروشور کیت را به طور کامل مطالعه نموده و برای انجام آزمایش از دستورالعمل های کیت پیروی کنید و آنها را تغییر ندهید. فقط با رعایت کامل این دستورالعمل می توان از کیت الایزا AMH Gold Medi Test Plus نتایج درست و صحیح بدست آورد.

هدف از استفاده:

کیت AMH Gold Medi Test Plus به روش الایزا جهت اندازه گیری کمی هورمون (Anti Mullerian Hormone) در نمونه سرم/ پلاسما انسان کاربرد دارد. این کیت فقط برای AMH (In Vitro Diagnostic) IVD و جهت استفاده در آزمایشگاه های تشخیص پزشکی کاربرد دارد .

مقدمه:

AMH یک گلیکوپروتئین هومودایمری است که زیر واحدهای آن توسط پل های دی سولفیدی به هم متصل شده است. این هورمون در اوایل رشد جنین پسر توسط بافت بیضه تولید و سبب رشد اندام های جنسی مردانه می شود در حالیکه این هورمون در جنین دختر تولید نمی شود و عدم حضور این هورمون اجازه می دهد که اندام جنسی زنانه رشد کند. سطح این هورمون در نوزادان پسر بالاست و تا ۲ سالگی بالا می ماند. سپس به تدریج کاهش یافته و در سن بلوغ به میزان حداقل خود می رسد. سطح این هورمون در دختران تا سن بلوغ پایین بوده و در دوره پیش از بلوغ تولید آن در تخمدان ها آغاز شده و سطح آن افزایش می یابد. AMH در زنان هورمونی است که توسط فولیکول های در حال رشد حاوی تخمک تولید می شود. از این رو شاخص مناسبی برای تعداد و کیفیت تخمک های در حال تولید در چرخه قاعدگی محسوب می شود. AMH برخلاف FSH، Inhibin B و استرادیول در تمام طول دوره قاعدگی ثابت است از این رو انجام این تست در هر زمان از این دوره امکان پذیر است. AMH تحت تاثیر گنادوتروپین ها قرار نمی گیرد و صرفاً بازتابی از جمعیت فولیکول ها می باشد و در ارزیابی قدرت باروری زنانی که با خطر کاهش فولیکولی تخمدان روبرو هستند کمک کننده است. از جمله در زنانی با تخمدان پلی کیستیک یا دارای سابقه خانوادگی یائسگی زودرس (نارسایی تخمدان)، سابقه آندومتریوز شدید ، شیمی درمانی یا جراحی قبلی بر روی تخمدان ، زنان مبتلا به بیماری های اتوایمیون ، عفونت لگن و زنانی که از رژیم های گیاخهخواری استفاده می کنند.

اساس روش سنجش:

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

طراحی کیت AMH بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک ساندویچی با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال می باشد. در این روش آنتی ژن مورد سنجش طی دو مرحله بین آنتی بادی تثبیت شده در ته چاهک های پلی استایرنی و آنتی بادی دوم متصل به آنزیم پراکسیداز (HRP) که شاخص های آنتی ژنیک متمایزی را روی مولکول AMH شناسایی می کند قرار می گیرد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیت های غیر متصل به آنتی بادی ته چاهک، با افزودن سوپستر-رنگزا (TMB)، رنگ آبی ایجاد می شود. با اضافه نمودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. شدت رنگ ایجاد شده با غلظت AMH ارتباط مستقیم دارد.

قرائت نتایج با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر(با رفرانس ۶۳۰ نانومتر) انجام می گیرد.

محتویات کیت:

توجه: معرف های موجود در این کیت حداکثر برای آزمایش ۸۸ نمونه در یک سری آزمایش کافی است.

آزمایش (AMH Coated Micro Titration Strip):

یک پلیت، دارای ۹۶ چاهک پوشش داده شده با آنتی بادی علیه AMH در پوشش آلمومینیومی همراه با رطوبت گیر بسته بندی شده است. هر چاهک حاوی آنتی بادی نوترکیب علیه AMH است.چاهک ها یا نوارهای استفاده نشده را همراه با رطوبت گیر در کیسه پلاستیکی زپت دار که برای نگهداری آن ها تدارک دیده شده است قرار دهید و در یخچال به دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد برگردانید. پلیت پس از باز شدن، به مدت ۲ ماه در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد پایدار است.

۲-سری استاندارد‌ها: کیت شامل شش ویال استاندارد آماده مصرف حاوی آنالیت AMH با غلظت های ۰٫۵/، ۱٫۰/، ۲٫۰/، ۵/ و ۱۰ (ng/mL) در بافر حاوی پروتئین می باشد. حجم تمامی استاندارد ها ۱ml می باشد.

۳-سرم کنترل ها (Control Serums) : کیت حاوی یک ویال سرم کنترل پایین (Low control) دارای مایعی زرد رنگ در یک ویال بی رنگ با در پیچ سبز و کنترل بالا (High control) دارای مایعی زرد رنگ در یک ویال بی رنگ با در پیچ قرمز با حجم ۱ml و با غلظت مشخص شده بر روی برچسب ویال می باشد. ویال های کنترل آماده مصرف می باشند.

۴-بافر رقیق کننده (Assay Buffer) : محلول آماده مصرف سبز رنگ در یک ویال سفید با در پیچ سفید با حجم ۶ml می باشد و پس از باز شدن درب ویال به مدت ۲ ماه در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد پایدار می باشد.

۵-کونژوگه- HRP (کونژوگه با HRP در بافر پروتئینی به همراه نگهدارنده): محلول قرمز رنگ کونژوگه نشاندار شده با آنزیم HRP ، با حجم ۶ml در یک ویال سفید با در پیچ سفید و آماده مصرف می باشد. پس از باز شدن درب ویال به مدت ۲ ماه در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد پایدار می باشد.

۶-محلول سوپستر-رنگزا (TMB Substrate) : محلول سوپستر-رنگزا حاوی تترا متیل بنزدین و آب اکسیژنه، مایعی بی رنگ در یک ویال قهوه ای با در پیچ قهوه ای، با حجم ۱۲ml آماده مصرف بوده و پس از باز شدن درب ویال به مدت ۲ ماه در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد پایدار است.

۷-بافر شستشو (Wash Buffer) : مایعی بی رنگ در یک ویال شفاف با در پیچ آبی با حجم ۲۵ml می باشد. قبل از استفاده باید با آب مقطر یا آب دیونیزه به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شود. پس از رقیق سازی به مدت یک هفته در دمای اتاق، یا به مدت ۲ ماه در صورت نگهداری در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد پایدار است.

۸-محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution) : مایعی بی رنگ در یک ویال سفید با در پیچ قرمز که حاوی محلول اسید سولفوریک رقیق شده ۰٫۵ مولار و آماده مصرف با حجم ۱۲ml می باشد . پس از باز شدن درب ویال، به مدت ۲ ماه در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد پایدار است.

۹-یک عدد کیسه پلاستیکی زیپ دار : جهت نگهداری نوارهای استفاده نشده

۱۰-دو برگ برچسب : مخصوص پلیت جهت پوشاندن چاهک ها در مدت انکوباسیون و جلوگیری از تبخیر یا آلودگی چاهک

۱۱- بروشور کیت

مواد و وسایل لازم که در کیت موجود نمی باشند:

۱-سمپلرهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق (درصورت امکان سمپلر ۸ کاناله با قابلیت برداشت ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک)

۲-آب مقطر یا آب دیونیزه تازه (ترجیحا با هدایت الکتریکی مطلوب)

۳-دستگاه خوانشگر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و ۶۳۰ نانومتری به عنوان فیلتر رفرانس

۴-دستمال جاذب رطوبت یا پارچه تمیز

۵-دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو باشد. (سیستم آسپیراسیون / شستشوی چاهک)

۶-دستکش یک بار مصرف

۷-تایمر

۸-ظروف زباله مناسب برای مواد بالقوه آلوده شده

۹-سر سمپلر یک بار مصرف

احتیاط و ایمنی :

۱.آزمایش های الایزا به زمان و دما حساس هستند. برای پرهیز از ایجاد نتایج اشتباه ، دقیقاً در مراحل روش آزمایش بدون اعمال تغییر پیروی کنید.

۲.معرف های مربوط به شماره ساخت های مختلف را با یکدیگر استفاده ننمایید و همچنین از استفاده محلول های کیت تجاری دیگر پرهیز نمایید. محتویات این کیت دقیقاً برای اجرای آزمایش به نحوه مطلوب فقط برای همین کیت فراهم شده اند.

۳.مطمئن شوید که تمام معرف ها براساس آنچه برروی کیت و برای یک شماره ساخت بیان شده معتبر باشد. هرگز از معرف ها بعد از تاریخ انقضایی که برروی برچسب یا جعبه بیان شده استفاده نکنید.

۴. توجه-مرحله مهم: اجازه دهید معرف ها و نمونه ها قبل از استفاده به دمای اتاق (۳۰-۱۸ درجه سانتیگراد) برسند. معرف ها را قبل از استفاده به آرامی تکان دهید. پس از استفاده فوراً به ۲-۸ درجه سانتیگراد بازگردانید.

۵.آنگونه که در مراحل روش آزمایش بیان شده است، فقط از حجم کافی نمونه استفاده کنید. زیرا در غیر این صورت از حساسیت آزمایش کاسته خواهد شد.

۶.کف خارجی چاهک ها را با دست لمس نکنید، اثر انگشت یا خراش می تواند در خواندن نتایج اختلال ایجاد نماید. در هنگام خواندن نتایج آزمایش از خشک بودن کف پلیت و فقدان حباب های هوا در داخل چاهک ها اطمینان حاصل نمایید.

۷.هرگز نگذارید چاهک ها بعد از مرحله شستشو خشک شوند. فوراً مرحله ی بعدی را آغاز کنید. موقع افزودن معرف ها از تشکیل حباب های هوا اجتناب کنید.

۸.از وقفه های طولانی مدت در مراحل آزمایش اجتناب کنید. از یکسان بودن شرایط کاری برای همه چاهک ها اطمینان حاصل کنید.

۹.سمپلرها را در زمان مشخص کالیبر نمایید تا از درستی حجم نمونه ها/ معرف هایی که توزیع می کنید مطمئن شوید. از سرسمپلرهای جداگانه یک بار مصرف برای نمونه و معرف ها استفاده کنید تا از آلودگی های متقاطع جلوگیری شود.

۱۰.هنگام افزودن نمونه ها، سرسمپلر با ته چاهک تماس پیدا نکند.

۱۱.هنگام سنجش با خوانشگر پلیت ،جذب را در طول موج ۴۵۰ نانومتر یا در ۶۳۰/۴۵۰ نانومتر اندازه گیری نمایید.

۱۲.فعالیت آنزیمی HRP-کونژوگه ممکن است تحت تاثیرگرد و غبار و مواد شیمیایی فعال و موادی مثل هیپوکلریت سدیم، اسیدها، قلیاها و غیره قرار گیرد. آزمایش را در حضور این مواد انجام ندهید.

۱۳.اگر از دستگاه تمام اتوماتیک استفاده می کنید، طی انکوباسیون پلیت ها را با برچسب مخصوص پلیت نپوشانید، همچنین می توان بعد از شستشو از خارج کردن ذرات باقیمانده داخل پلیت به وسیله ضربه آرام صرف نظر کرد.

۱۴.فقط برای مصرف آزمایشگاهی (For In vitro diagnostic use) و توسط افراد حرفه ای صلاحیت دار می باشد.

۱۵.همه نمونه های با منشاء انسانی باید بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند. پیروی دقیق از مقررات GLP می تواند موجب اطمینان از ایمنی فردی شود.

۱۶.به هنگام انجام آزمایش و جابجایی محلول ها از رویوش آزمایشگاه ، دستکش یک بار مصرف و وسایل حفاظت فردی استفاده کنید.

۱۷.تمام معرف ها و مواد باقیمانده را با رعایت اصول ایمنی و مقررات قابل اجرا مدیریت نموده و امحا نمایید.

هشدار: ممکن است در تهیه کنترل های کیت از موادی با منشاء انسانی استفاده شده باشد. این مواد با کیت های آزمایشگاهی دارای عملکرد قابل قبول آزمایش شده و نتیجه آزمایش برای وجود آنتی بادی های anti-HCV ، anti-HIV ½ و HBs Ag منفی بوده اند. اما هیچ روش آنالیتیکی وجود ندارد که بتواند از فقدان کامل عوامل عفونی در نمونه ها یا معرف ها اطمینان دهد. لذا تاکید می گردد با معرف ها و نمونه ها همچون عوامل انتقال دهنده بیماری های عفونی و با احتیاط بسیار رفتار کنید.

۱۸.با مواد شیمیایی و بیولوژیک باقیمانده مطابق با مقررات جاری GLP و مقررات محلی یا ملی رفتار نمایید.

۱۹.قبل از دفع پسماندهای آلوده برای آلودگی زدایی؛ سر سمپلرها، ویال ها، نوارها و ظروف نمونه را جمع آوری کرده و حداقل به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو نموده یا به مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱٪ قرار دهید. محلول های حاوی هیپوکلریت سدیم هرگز نباید اتوکلاو شوند. در صورت درخواست به برگه اطلاعات ایمنی مواد (MSDS) مراجعه شود.

۲۰.برخی از معرف ها از جمله محلول متوقف کننده واکنش، محلول های رنگزا و بافر شستشو بصورت مواد خام ممکن است سمی، التهاب زا، سوزاننده و یا اثر سرطان زایی داشته باشند. از تماس پوست یا مخاط با این معرف ها اجتناب شود.

۲۱.محلول متوقف کننده واکنش، اسید سولفوریک (H₂SO₄) نیم مولار (۵M/۰۵) است. با احتیاط از آن استفاده کنید. در صورت تماس با پوست یا چشم ها با آب فراوان شستشو دهید.

۲۲. ProClin™300(0.1%) که به عنوان نگهدارنده استفاده شده است، می تواند باعث حساسیت پوستی شود. در صورت تماس با پوست یا چشم ها با آب فراوان شستشو دهید.

جمع آوری، حمل و نقل و نگهداری نمونه :

•جمع آوری نمونه:

۱.نمونه را براساس روال عادی آزمایشگاه جمع آوری کنید. از نمونه های سرم یا پلاسمای تازه می توان برای آزمایش استفاده نمود. باید اجازه داد که خون گرفته شده از ورید بطور طبیعی و سرم یا پلاسما حتی الامکان هرچه زودتر از لخته جدا شود تا از همولیز شدن گلبول قرمز اجتناب گردد. برای اطمینان از این که نمونه های سرم شفاف و بدون آلودگی میکروبی هستند باید توجه لازم را به کار برد. (RPM) به مدت ۲۰ دقیقه دردمای اتاق یا با فیلتراسیون برطرف کرد.

۲.از نمونه های جمع آوری شده از سرم و یا پلاسمای حاوی ضدانعقاد هپارین و EDTA می توان استفاده کرد.

۳.از نمونه های لیپمیک، ایکتریک و همولیز نباید استفاده شود زیرا این نمونه ها می توانند موجب نتایج کاذب شوند. نمونه ها را توسط حرارت غیرفعال نکنید. این کار می تواند باعث افت آنتی ژن مورد نظر گردد. از نمونه های با آلودگی میکروبی قابل رویت هرگز نباید استفاده شود.

•حمل و نقل و نگهداری نمونه:

۱.از انجماد و ذوب کردن مکرر نمونه ها بیش از ۲ بار جلوگیری شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی و به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردند.

۲.کیت AMH Gold Medi Test Plus فقط برای آزمایش کردن نمونه های سرم یا پلاسما در نظر گرفته شده است. از این کیت برای آزمایش کردن نمونه جسد، بزاق، ادرار، خون مخلوط شده و یا سایر مایعات بدن استفاده نکنید.

۳.نمونه ها را در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری کنید. اگر آزمایش نمونه ها در فاصله ۲۴ ساعت پس از نمونه گیری انجام نمی شود؛ جهت جلوگیری از آلودگی باکتریایی، نمونه ها را در فریزر و در دمای ۲۰- تا ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمایید.

جهت ارسال و انتقال نمونه باید مطابق با مقررات محلی و بین المللی موجود برای حمل ونقل نمونه های بالینی و عوامل بیولوژیک عمل نموده و بسته بندی و برچسب گذاری مناسب انجام شود.

نگهداری و پایداری کیت :

۱.در صورت نگهداری در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد محتویات کیت تا تاریخ انقضای نوشته شده بر روی برچسب و جعبه کیت پایدار خواهند بود. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.

۲.محلول شستشو بهتر است روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز مصرف شود.

۳.تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها؛ نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.

۴.محلول سوپستر-رنگزا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و قابل استفاده نمی باشد.

۵.اجزاء کیت ها با سری خاص متفاوت نباید با یکدیگر استفاده شوند و از جابه جایی درب معرف ها پرهیز شود.

نشانه های ناپایداری (افت) معرف ها: خارج شدن مقادیر کنترل های Low و High کیت از محدوده ی ادعایی بیان شده، نشان دهنده احتمال افت معرف ها و یا خطای اپراتور یا تجهیزات مورد استفاده است. در چنین مواردی باید نتایج را نامعتبر در نظر گرفت و نمونه ها را دوباره آزمایش نمود. در صورتی که همچنان نتایج اشتباه بدست آید وعلت آن افت یا ناپایداری معرف ها باشد، معرف ها را با معرف جدید فوراً جایگزین کنید یا برای دریافت راهنمایی بیشتر با پشتیبان فنی Gold Medi Test Plus تماس بگیرید.

آماده سازی معرف ها:

•اجازه دهید کیت و معرف ها به دمای اتاق (۳۰-۱۸ درجه سانتیگراد) برسند.

•تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشو، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (۲۰X) را با ۱۹ حجم آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق نمائید. محلول شستشو به مدت یک هفته در دمای اتاق پایدار است.

•بافر شستشوی غلیظ را از نظر وجود کریستال نمک بررسی کنید. در صورت وجود کریستال با گرم کردن در ۳۷ درجه سانتیگراد آنها را حل کنید.

•سایر معرف ها آماده مصرف هستند.

مراحل انجام آزمایش:

مرحله ۱- آماده سازی : دو چاهک برای کنترل بالا و پایین و شش چاهک جهت استاندارد‌ها و به تعداد بیماران چاهک در نظر بگیرید و مابقی چاهک ها را به همراه رطوبت گیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آن را ببندید. پیشنهاد می گردد استانداردها را به صورت دوتایی آزمایش کنید.

مرحله ۲- افزودن نمونه: ۵۰ میکرولیتر از نمونه ها ، استانداردها و کنترل ها درون چاهک ها اضافه نمایید.

توجه: برای هر یک از استانداردها ،کنترل ها و نمونه ها از سر سمپلر جداگانه استفاده شود تا از آلودگی جلوگیری گردد.

مرحله ۳-افزودن بافر رقیق کننده : ۵۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده به همه چاهک ها اضافه کرده و به مدت ۶۰ ثانیه پلیت را به آرامی و بصورت ضربه ای شیک نمایید.

مرحله ۴- انکوبه کردن: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۳۰-۱۸ درجه سانتیگراد) انکوبه نمایید.

مرحله ۵- شستشو: پلیت را ۴ مرتبه و با حجم ۳۰۰-۳۵۰ میکرولیتر شستشو دهید. در هر مرحله چاهک ها جدید محلول شستشو به مدت ۲۰-۴۰ ثانیه درون چاهک ها باقی بماند. در انتهای شستشو با ضربه زدن آرام پلیت بر روی دستمال نمگیر یا کاغذ جاذب ، رطوبت باقی مانده را خارج نمایید.

مرحله ۶- افزودن کونژوگه- HRP : ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه- HRP را به تمامی چاهک ها اضافه نموده و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی و به صورت ضربه ای شیک نمایید. مرحله ۷ - انکوباسیون: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۳۰-۱۸ درجه سانتیگراد) قرار دهید.

مرحله ۸ - شستشو: مطابق با روش مرحله ۵ ، محتویات چاهک ها را خالی نمایید و عمل شستشو را انجام دهید.

مرحله ۹- ایجاد رنگ : ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوپستر-رنگزا (TMB) به کلیه چاهک ها اضافه نمایید.

مرحله ۱۰ - انکوباسیون: پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و به دور از نور انکوبه نمایید. واکنش آنزیماتیک بین رنگزا و HRP باعث ایجاد رنگ آبی در چاهک های استاندارد (به جز استاندارد صفر) و نمونه های حاوی AMH می شود.

مرحله۱۱- اضافه کردن محلول متوقف کننده واکنش: ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را با استفاده از سمپلر چند کاناله یا به روش دستی به همه چاهک ها اضافه نمایید و به آرامی مخلوط کنید. رنگ آبی بعد از افزودن محلول متوقف کننده به رنگ زرد تغییر خواهد کرد.

مرحله ۱۲- خوانش : پلیت را با فیلتر ۴۵۰ نانومتر و فیلتر رفرانس ۶۳۰ نانومتر خوانش نمایید. (توجه: مقدار جذب نوری را حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از توقف واکنش اندازه گیری نمایید.)

روش شستشو:

•برای دستیابی به نتایج درست و دقیق، روش شستشوی مناسب ضروری است. بنابراین توصیه می شود از یک دستگاه شستشو کننده پلیت الایزا با کیفیت خوب استفاده کنید. برای پیشگیری از ایجاد واکنش های مثبت کاذب و رنگ زیاد زمینه، توصیه می شود شستشو در هر مرحله از روند آزمایش ، به تعداد ۴ مرتبه با حجم ۳۰۰ تا ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو ترجیحا توسط سیستم اتوماتیک در هر چاهک انجام شود.

•بعد از انکوباسیون، برای جلوگیری از آلودگی های متقاطع پلیت با نمونه ها یا کونژوگه- HRP، محتویات چاهک ها را دور نریزید بلکه اجازه دهید دستگاه شستشو کننده پلیت (ELISA Washer)، به طور اتوماتیک آنها را آسپیره کند.

•مطمئن شوید که کانال های توزیع کننده مایع در شستشو کننده پلیت، گرفتگی یا آلودگی نداشته باشند و حجم کافی از بافر شستشو هر بار در چاهک ها ریخته شود.

•بافر شستشوی غلیظ را قبل از استفاده باید به نسبت ۱/۲۰ رقیق کرد. اگر از همه چاهک های یک پلیت استفاده نمی کنید، حجم متناسبی از محلول را تهیه نمایید.

محاسبه نتایج:

جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه خوانشگر الایزا در طول موج ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر خوانش نمایید.

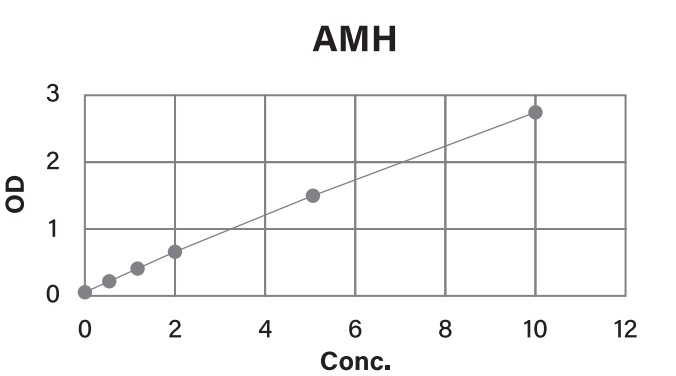
با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها وغلظت آن ها، نمودار نقطه- به- نقطه (Point-to-point) رسم کنید. به طوری که جذب نوری استاندارد روی محور عمودی Y و غلظت آن روی محور افقی X برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد به دست آورده و سپس به یکدیگر وصل نموده و منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از نقاط تلاقی محورهای Y و X عبور کرده باشد، رسم کنید تا منحنی به دست آید.

•میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محورY جای آن را پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه به دست آمده خطی عمود بر محورافقی X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، به دست آید.

•در صورتی که ازاسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت استفاده می کنید جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید.
•اگر نمونه های مورد آزمایش نتایج بالاتر از آخرین استاندارد کیت را نشان دهند غلظت AMH در نمونه باید بیش از ۱۰ ng/ml گزارش شود و بایستی جهت به دست آوردن غلظت صحیح، سرم را با استاندارد صفر رقیق نمود و پس از به دست آوردن غلظت نمونه رقیق شده، عدد حاصل را در ضریب رقت ضرب نمود.

جذب نوری OD	استانداردها ng/ml	ردیف
0.06	0	STD A
0.21	0.5	STD B
0.35	1	STD C
0.65	2	STD D
1.53	5	STD E
2.73	10	STD F
0.22	0.54	Low Control
1.57	5.26	High Control

نمودار استاندارد برای AMH



نمودار استاندارد برای AMH

کنترل کیفیت :

نتایج تست در صورتی تایید می گردد که:

۱- جذب نوری استاندارد صفر کمتر از ۰/۰۹ باشد.

۲- جذب نوری استاندارد آخر بیشتراز ۱/۴ باشد.

۳ -خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
توصیه می گردد جهت حصول اطمینان از نتایج کیت علاوه بر کنترل‌های ارائه شده در کیت، به صورت دوره ای از کنترل‌های دقت و صحت تجاری نیز استفاده گردد.
بدیهی است نتایج بدست آمده بایستی در محدوده مورد قبول باشد.

مقادیر مورد انتظار:

به دلیل تفاوت های بیولوژیک بین جمعیت های مختلف و همچنین عواملی نظیر سن، جنس، نژاد و عوامل جغرافیایی پیشنهاد می گردد هر آزمایشگاهی مقادیر نرمال بازه مرجع خود را بدست آورد:

محدوده طبیعی (ng/ml)	میانه (ng/ml)	جنسیت / سن
1.5 - 13.4	4.8	مردان بالغ
0.62 - 10.9	3.3	زنان
1.3 - 9.6	3.6	
0.7 - 7.6	2.4	
0.1 - 4.3	0.7	
2.5 - 19.6	5.7	زنان با سندروم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)

ویژگی های اختصاصی کیت :

اختصاصیت (Specificity):

نتایج اختصاصیت این کیت برروی نمونه هایی با غلظت های مختلف از مواد زیر که واکنشهای متقاطع ایجاد می کنند به شرح زیر می باشد:

آنالیت مداخله کننده	غلظت	مقادیر اندازه گیری شده (ng/ml)				میزان تداخل (%)
hFSH	100 mIU/ml	0.07	0.09	0.08	0.05	0.07
hLH	100 mIU/ml	0.03	0.04	0.06	0.07	0.05
Inhibin A	100 ng/ml	0.05	0.07	0.06	0.06	0.06
Inhibin B	100 ng/ml	0.03	0.05	0.06	0.05	0.04
Activin A	100 ng/ml	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08
Activin B	100 ng/ml	0.04	0.02	0.03	0.05	0.03
Activin AB	100 ng/ml	0.03	0.05	0.07	0.06	0.05

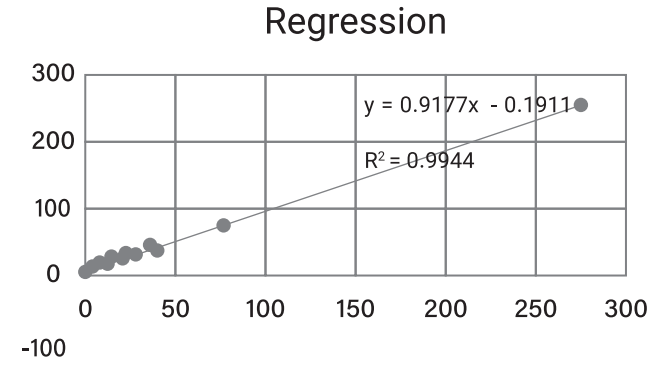
نمودار استاندارد برای AMH

حساسیت Sensitivity :

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 10 تست) 0.05ng/ml می باشد.

صحت Accuracy :

جهت بررسی صحت آزمایش، تست همبستگی بر اساس پروتکل(CLSI(EP29-A به طور همزمان بر روی 120 نمونه سرم در سطوح مختلف با کیت الایزای تجاری معتبر در بازار و کیت AMH Gold Medi Test Plus انجام گردید. نتایج این بررسی ها همبستگی حدود 99.4 درصد را نشان می دهد.



دقت Precision:

شاخص دقت بر مبنای استاندارد(CLSI(EP5-A2 ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان 3 نمونه AMH با غلظت های مختلف اندازه گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات آنها محاسبه شده است که در جدول زیر آمده است:

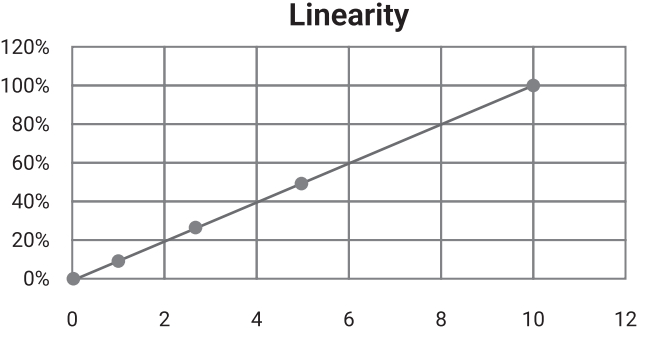
Panel Member	Batch	تعداد	میانگین	Within-run Precision SD	%CV
1	1	20	0.49	0.021	4.41
2	1	20	7.54	0.255	3.38
3	1	20	20.5	1.44	7.0

Panel Member	Batch	تعداد	میانگین	Between-run Precision SD	%CV
1	1	20	0.56	0.045	8.10
2	1	20	7.48	0.339	4.52
3	1	20	20.17	0.445	2.20

خطی بودنLinearity :

برای این منظور از استاندارد 10 ng/ml توسط استاندارد 0، رقت های مختلف تهیه و هر نمونه سه مرتبه تکرار گردید. نتایج به شرح زیر می باشد:

Bias (%)	Recovery (%)	میانگین (ng/ml)	مقدار به دست آمده (ng/ml)			مقدار مورد انتظار (ng/ml)	میزان رقت
NA	NA	0.03	0.05	0.008	0.02	0	0%
-8	92.3	0.92	0.91	0.95	0.91	1	10%
6.8	106.9	2.67	2.12	2.86	3.04	2.5	25%
2.2	102.1	5.11	5.71	4.98	4.63	5	50%
7.1	107.1	10.71	10.5	10.48	11.14	10	100%



تست بازایی (Recovery Test) :

تست بازایی یا Recovery روشی برای تشخیص خطاهای سیستماتیک مربوط به نمونه و همچنین بررسی پایداری نمونه پس از جمع آوری به کار می رود. یک نمونه عادی یک بار در شرایط اولیه خود و بار دیگر پس از اضافه نمودن غلظت مشخصی از یک آنالیت به نمونه، مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. اختلاف بین دو مقدار اضافه شده و اندازه‌گیری شده در محاسبه بازیافت مورد استفاده قرار می‌گیرد.

برای این منظور از استاندارد 10ng/ml به عنوان استاندارد پایه استفاده شد و چهار غلظت 0.2 ng/ml، 1، 5 و 10 به استاندارد پایه اضافه شد.

مقدار افزوده شده (%)	مقدار مورد انتظار (%)	غلظت بازیافت شده (%)	ریکاروری (%)
0.2	5.1	5.0	98.04
1.0	5.5	5.2	94.5
5.0	7.5	7.7	102.6
10	10	10.4	104

اثر هوک: در این کیت برای نمونه های تا غلظت 1000ng/ml اثرهوک دیده نشد.

منابع :

- Jpling H., et al. Paediatric Anti-Mullerian Hormone measurement: Male and female reference intervals established using the automated Beckman Coulter Access AMH assay. Endocrinol Diabetes Metab.4(1): e2018 ,00021
- Hampl R., et al. Antimullerian Hormone (AMH) Not Only a Marker for Prediction of Ovarian Reserve. Physiol. Res. :60 2011 ,217223
- Matuszczak E., et al. Serum AMH in Physiology and Pathology of Male Gonads. Int J Endocrinol. 2013 ,128907
- injection. Fertility and Sterility; 2014 ,40 - 1633:(6)102
- NELSON SM., et al. Comparison of antimullerian 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; 2015 ,30 - 923:(4)103
- CHAI J, HOWIE AF. A highly-sensitive anti-Mullerian hormone assay improves analysis of ovarian function following chemotherapy for early breast cancer. European Journal of Cancer; 2014 ,74 - 2367:(14)50
- FONG SL., et al. The role of anti-Mullerian hormone in the classification of anovulatory infertility. European Journal of Obstetrics & Gyne- cology and Reproductive Biology; - 186:75 2015 ,9
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition NCCLS Document EP-25A. 2009.
- Wu AHB. Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests. Saunders, Philadelphia 3rd edition, p. 1995 ,594
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP-5A2004 .2
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking – First Edition. EP.34 2018

خلاصه محتویات اصلی کیت

از این خلاصه فقط جهت اشاره ای به محتویات کیت استفاده کنید و هنگام انجام آزمایش همیشه از صفحه مبسوط روش پیروی نمایید.

پلیت	Microwell Plate	1 x 96 wells
کنترل ها	Control Vials	2 x 1 ml
استاندارد ها	Calibration Curve Standards	6 x 1 ml
بافر رقیق کننده	Assay Buffer	1 x 6 ml
کونژوگه-HRP	HRP-Conjugate	1 x 6 ml
بافر شستشو	Wash Buffer	1 x 25 ml
محلول سوبستر-رنگزا	TMB Substrate	1 x 12 ml
محلول متوقف کننده واکنش	Stop Solution	1 x 12 ml

خلاصه مراحل انجام آزمایش

- افزودن نمونه ها و کنترل ها و استاندارد ها 50 میکرولیتر
- افزودن بافر رقیق کننده 50 میکرولیتر
- انکوبه کردن 30 دقیقه،دمای اتاق
- شستشو 4 مرتبه
- افزودن کونژوگه-HRP 50 میکرولیتر
- انکوبه کردن 30 دقیقه،دمای اتاق
- شستشو 4 مرتبه
- افزودن سوبستر-رنگزا(TMB) 100 میکرولیتر
- انکوبه کردن 30 دقیقه،دمای اتاق و تاریکی
- توقف واکنش 100 میکرولیتر
- خوانش 630/450 نانومتر

نمادها :

⚠	شرایط نگهداری 2-8 درجه سلسیوس	⚠	هشدار
LOT	شماره ساخت	🕒	تاریخ انقضاء
📖	دستورالعمل استفاده	📅	تاریخ تولید
🏭	تولیدکننده	⚖	محتویات کیت(تعداد)آزمایش
⚠	خطر زیستی	🚫🚰	از خوردن و آشامیدن خودداری شود
REF	شماره کاتالوگ	🏥🧪	اباس محافظت کننده ومحافظ چشم بهرشید
☒	ProClin™ 300	IVD	برای استفاده خارج از بدن

- شماره بازبینی : 01 - 1402
- تاریخ انتشار : اردیبهشت ماه 1402
- تهران، جاده قدیم کرج، جاده شهریار، بعد از شهرک سعید آباد، حسن آباد خالصه، مجتمع علمی صنعتی عصر انقلاب ، خیابان دانش، خیابان فناوریان، نبش خیابان نانوفناوری، شرکت آریا مبنا تشخیص
- وب سایت: www.aryamabna.com
- کدپستی: 3313193685
- تلفن: 066512800(10 خط)
- ایمیل: info@aryamabna.com

Gold medi® test plus

E I A D I A G N O S T I C K I T
THE EIA DIAGNOSTIC KIT FOR 96 TESTS