

AMH ELISA KIT
کیت کمی تعیین هورمون AMH
IVD چاهک ۹6% 1062 REF

قبل از انجام آزمایش، بروشور کیت را به طور کامل مطالعه نموده و برای انجام آزمایش از دستورالعمل‌های 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 AMH (Anti Mullerian Hormone) در نمونه سرم/ پلاسما انسان کاربرد دارد. این کیت فقط برای AMH (In Vitro Diagnostic) IVD و جهت استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی کاربرد دارد .

مقدمه:

AMH یک گلیکوپروتئین هومودایمری است که زیر واحدهای آن توسط پِل 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 صرفا 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 گیاهخواری استفاده می کنند.

اساس روش سنجش:

طراحی کیت AMH بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک سانودیچی میباشد. در این روش آنتی ژن مورد سنجش به آنتی بادی تثبیت شده در ته چاهک های پلی استایرنی افزوده شده و آنتی بادی دوم بیوتینبله که نسبت به آنتی بادی فاز جامد شاخص های آنتی ژنیک متمایزی را روی مولکول AMH شناسایی می‌کند، قرار میگیرد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیت های غیر متصل با افزودن استرپتواویدین کوئژوگه یا HRP، از ناحیه بیوتین به کمپلکس بالا متصل می شود. در ادامه پس از شستشو و افزودن محلول سوبسترا-رنگزا ، رنگ آبی ایجاد می کند. با اضافه نمودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. شدت رنگ ایجاد شده با غلظت AMH ارتباط مستقیم دارد.

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

محتویات کیت:

۱-پلیت (AMH Coated Micro Titration Strip):

یک پلیت، دارای ۹۶ چاهک پوشش داده شده با آنتی بادی علیه AMH در پوشش آلومینیومی 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 زیپ دار که برای نگهداری آن ها تدارک دیده شده است قرار دهید و در یخچال به دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد برگردانید. پلیت پس از باز شدن، به مدت ۲ ماه در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد پایدار است.

۲-سری استاندارد‌ها: کیت شامل هفت ویال استاندارد آماده مصرف حاوی آنالیت AMH با غلظت های مشخص شده بر روی برچسب ویال در بافر حاوی پروتئین می باشد. حجم تمامی استاندارد ها ml ۱/۵ می باشد.

۳-سرم کنترل ها (Control Serums): کیت حاوی یک ویال سرم کنترل پایین (Low control) یک ویال سرم کنترل بالا (High control) با حجم ml ۱/۵ و با غلظت مشخص شده بر روی برچسب ویال می باشد. ویال های کنترل آماده مصرف می باشند.

۴- کوئژوگه آنتی بادی - بیوتین در بافر پروتئینی به همراه نگهدارنده با حجم ml ۱۲ می باشد و پس از باز شدن درب ویال به مدت ۲ ماه در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد پایدار می باشد.

۵-کوئژوگه استرپتواویدین - HRP (در بافر پروتئینی به همراه نگهدارنده) : محلول با حجم ml ۱۲ آماده مصرف می باشد.پس از باز شدن درب ویال به مدت ۲ ماه در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد پایدار می باشد.

۶-محلول سوبسترا- رنگزا (TMB Substrate) : محلول سوبسترا-رنگزا حاوی تترا متیل بنزدین و آب اکسیژنه، مایعی بی رنگ با حجم ml ۱۲آماده مصرف بوده و پس شدن درب ویال به مدت ۲ ماه در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد پایدار است. ۷-بافر شستشو (Wash Buffer) : یک ویال با حجم ml ۳۰ 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 ۸-۲ درجه سانتیگراد پایدار است.

۸-محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution) : مایعی بی رنگ در یک ویال که حاوی محلول اسید کلریدریک رقیق شده ۱ مولار و آماده مصرف با حجم ml ۶ می باشد . پس از باز شدن درب ویال، به مدت ۲ ماه در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد پایدار است.

۹-یک عدد کیسه پلاستیکی زیپ دار : جهت نگهداری نوارهای استفاده نشده ۱۰-یک 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 فرانس

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 از 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-حله مهم: اجازه دهید معرف ها و نمونه ها قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) برسند. معرف ها را قبل از استفاده به آرامی تکان دهید. پس از استفاده فوراً به ۸-۲ 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 کالبرر 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-کوئژوگه ممکن است تحت تاثیر گرد 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 نیوشانید، 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 منشأ 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 منشأ 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-HB۱/۲ 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 معرف 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 کلریدریک (HCl) یک مولار (۱M) 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.از نمونه های جمع آوری شده از سرم و یا پلاسمای حاوی EDTA می بایست استفاده کرد.

۲.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 رویی هرگز نباید استفاده شود.

•حمل و نقل و نگهداری نمونه:

۱.از انجامد 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 ۸-۲ 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 ۸-۲ 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 سوبسترا-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 ساخت 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 (۲۵-۲۰ 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 هفت 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: ۱۰۰میکرولیتر 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- انکوبه کردن: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵-۲۰درجه سانتیگراد) انکوبه نمایید.

مرحله ۴- شستشو: پلیت را ۵ مرتبه و با حجم ۳۰۰-۳۵۰میکرولیتر شستشو دهید. در هر مرحله اجازه دهید 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 ۵- افزودن کوئژوگه آنتی بادی-بیوتین : ۱۰۰میکرولیتر از محلول را به تمامی چاهک ها اضافه نموده و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی و به صورت ضربه ای شیک نمایید.

مرحله ۶- انکوباسیون: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) قرار دهید.

مرحله ۷- شستشو: مطابق با روش مرحله ۴، محتویات چاهک ها را خالی نمایید و عمل شستشو را انجام دهید.

مرحله ۸- افزودن کوئژوگه استرپتواویدین HRP:۱۰۰میکرولیتر از محلول را به تمامی چاهک ها اضافه نموده و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه به آرامی و به صورت ضربه ای شیک نمایید.

مرحله ۹- انکوباسیون: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) قرار دهید.

مرحله ۱۰- شستشو: مطابق با روش مرحله ۴، محتویات چاهک ها را خالی نمایید و عمل شستشو را انجام دهید.

مرحله ۱۱-ایجاد رنگ : ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا-رنگزا (TMB) به کلیه چاهک ها اضافه نمایید.

مرحله ۱۲ - انکوباسیون: پلیت را به مدت ۱۵ 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.

مرحله ۱۳- اضافه کردن محلول متوقف کننده واکنش: ۵۰ 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 خوانش : پلیت را با فیلتر ۴۵۰ نانومتر و فیلتر فرانس ۶۳۰ نانومتر خوانش نمایید. (توجه: مقدار جذب نوری را حداکثر تا ۱۰ 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 ۵ 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 کوئژوگه-HRP، محتویات چاهک ها را دور نریزید بلکه اجازه دهید دستگاه شستشو کننده پلیت (ELISA Washer)، به طور اتوماتیک آنها را آسییره 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:

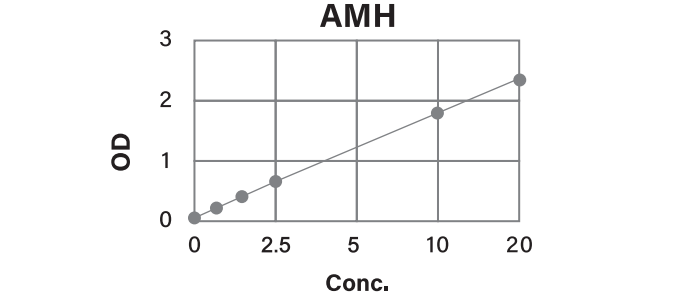
جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه خوانشگر الایزا در طول موج ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر خوانش نمایید.

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 محور Y 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 ۲۰ 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
0.02	0	STD A
0.1	0.5	STD B
0.25	1	STD C
0.52	2.5	STD D
0.94	5	STD E
1.65	10	STD F
2.78	20	STD G



کنترل کیفیت:

نتایج تست در صورتی تایید می گردد که:

۱- جذب نوری استاندارد آخر بیشتراز ۱/۳ باشد.

۲ -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:

Age group	Median(ng/mL)	5 th -95 th percentile (ng/mL)
Males (>12 years)	5.7	0.7-19
Boys (24 mo-12 y)	60	7.4-243
Females(13-25 years)	4.9	0.85-13.0
F (26-30 years)	4.07	0.1-8.5
F (31-35 years)	3.12	0.1-7.0
F (36-40 years)	1.81	0.09-6.1
F(41-45 years)	0.72	0.05-3.9
Girls (24 mo-12 y)	1.3	<8.9
Girls (<24 mo.)	-	<4.7
Females (diminished ovarian reserve)	-	<1.0
Females(Post-Menopausal)	-	<0.5

<0.36	پایین بودن ذخیره تخمدان (POF)
0.36-0.69	حد پایین ذخیره تخمدان
0.69-3.8	محدوده نرمال ذخیره تخمدان
3.8-8.9	حد بالای ذخیره تخمدان

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:

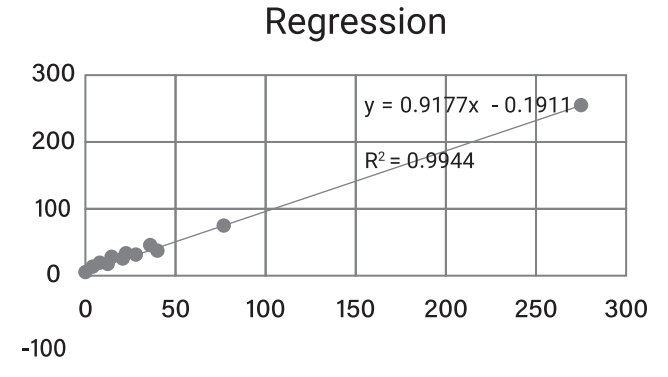
آتالیت مداخله کننده	غلظت	مقادیر اندازه گیری شده (ng/ml)				میزان تداخل (%)
hFSH	100 mIU/ml	0.07	0.09	0.08	0.05	0.07
hLH	100 mIU/ml	0.03	0.04	0.06	0.07	0.05
Inhibin A	100 ng/ml	0.05	0.07	0.06	0.06	0.06
Inhibin B	100 ng/ml	0.03	0.05	0.06	0.05	0.04
Activin A	100 ng/ml	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08
Activin B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

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) 0.03ng/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:

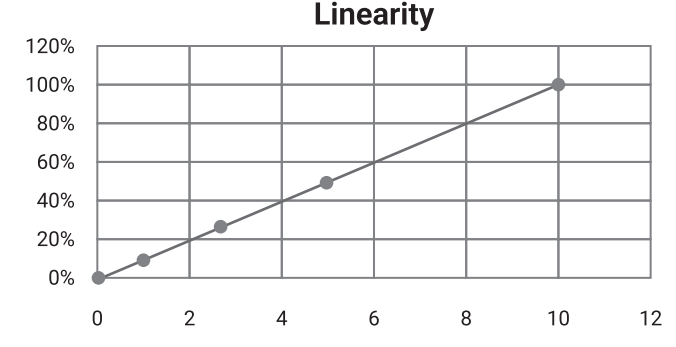
Panel Member	Batch	تعداد	میانگین	Within-run Precision SD	%CV
1	1	20	0.90	0.032	4.01
2	1	20	1.67	0.075	4.38
3	1	20	6.50	0.440	6.43

Panel Member	Batch	تعداد	میانگین	Between-run Precision SD	%CV
1	1	20	0.90	0.045	5.10
2	1	20	1.67	0.059	3.52
3	1	20	6.50	0.345	5.40

خطی بودنLinearity:

برای این منظور از استاندارد 20 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 0 ng/ml به عنوان استاندارد پایه استفاده شد و چهار رقت 0.2 ng/ml، 1، 5 و 10 تهیه گردید.

مقدار افزوده شده (%)	مقدار مورد انتظار (%)	غلظت بازیافت شده (%)	ریکاری (%)
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 2000ng/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 1.5 ml
استاندارد ها	Calibration Curve Standards	7 x 1.5 ml
کونژوگه آنتی بادی -بیوتین	Biotin-Conjugate	1 x 12 ml
کونژوگه استرپتواویدین-HRP	HRP-Conjugate	1 x 12 ml
بافر شستشو	Wash Buffer	1 x 30 ml
محلول سوبستر-رنگزا	TMB Substrate	1 x 12 ml
محلول متوقف کننده واکنش	Stop Solution	1 x 6 ml

خلاصه مراحل انجام آزمایش

- افزودن نمونه ها و کنترل ها و استاندارد ها 100 میکرولیتر
- انکوبه کردن 60 دقیقه،دمای اتاق
- شستشو 5 مرتبه
- افزودن کونژوگه آنتی بادی -بیوتین 100 میکرولیتر
- انکوبه کردن 30 دقیقه،دمای اتاق
- شستشو 5 مرتبه
- افزودن کونژوگه استرپتواویدین-HRP 100 میکرولیتر
- انکوبه کردن 15 دقیقه،دمای اتاق
- شستشو 5 مرتبه
- افزودن سوبستر-رنگزا(TMB) 100 میکرولیتر
- انکوبه کردن 15 دقیقه،دمای اتاق و تاریکی
- توقف واکنش 50 میکرولیتر
- خوانش 630/450 نانومتر

نمادها:

⚠	شرایط نگهداری 2-8 درجه‌سلسیوس	⚠ هشدار
LOT	شماره‌ساخت	🕒 تاریخ انقضاء
📖	دستورالعمل استفاده	📅 تاریخ تولید
🏭	تولیدکننده	🔍 محتویات کیت(تعداد)آزمایش
☠	خطرزیستی	🚫🚫 از خوردن و آشامیدن خودداری شود
REF	شماره کاتالوگ	🏠🏠🏠 لباس محافظت‌کننده و محافظ چشم بپوشید
☒	ProClin™ 300 S phrases: 026-26-367/29-45- 40-41 R phrases: 43	IVD برای استفاده خارج از بدن

شماره بازبینی: 1403-02 تاریخ انتشار: فروردین ماه 1404
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 مینا تشخیص
کدپستی: 3313193685 وب سایت: www.aryamabna.com
تلفن: 66512800(10 خط) ایمیل: info@aryamabna.com