معرف	48 تستی	۹۶ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با آنتی بادی علیه AMH	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور ۱-۷ (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر) در بافر پروتئینی، به همراه نگهدارنده	7 ×0.75 mL	7 ×1.5 mL	آماده مصرف
نمونه های کنترل در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده(بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)	2 ×0.75 mL	2 ×1.5 mL	آماده مصرف
کونژوگه آنتی بادی-بیوتین(آنتی بادی علیهAMH کونژوگه شده با بیوتین در بافر پروتئینی به همراه نگهدارنده)	1 ×6 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
کونژوگه استرپتاویدین-HRP(استرپتاویدین کونژوگه با HRPدر بافر پروتئینی به همراه نگهدارنده)	1 ×6 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ	1 ×30 mL	1 ×30 mL	به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا (تترا متیل بنزدین و آب اکسیژنه)	1 ×6 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول توقف (اسید کلریدریک ۱ مولار)	1 ×6 mL	1 ×6.0 mL	آماده مصرف

کاربرد:

کیت **Anti-Müllerian Hormone Gen II ELISA Kit** (نسل دوم کیت **AMH**)شرکت پیشگامان سنجش برای اندازه گیری کمی آنتی مولرین هورمون (**AMH**) یا **Müllerian-inhibiting hormone** (**MIH**) در سرم یا پلاسما طراحی شده است.

مقدمه :

آنتی مولرین هورمون(**AMH**) گلیکوپروتئین دو واحدی متعلق به خانواده ای از **TGF-Beta** می باشد که به طور اولیه نقش آن در تمایز جنسی مردان شناخته شد. تمامی اعضاء این خانواده در رشد و تمایز بافت ها نقش دارند. این هورمون در جنین نر توسط سلول های سرتولی ترشح شده، درنتیجه باعث تحلیل رفتن مجاری مولرین طی تمایز جنینی و رشد و تمایز اندام های جنسی نر می گردد. ترشح **AMH** در مردان در دوران جنینی آغاز شده و بعد از آن مستمراً تا دوران بلوغ ادامه پیدا کرده و بعد از کاهش مختصر و رسیدن سطح تولید به سطح بلوغ، ساخت آن تا پایان حیات فرد ادامه می یابد.

آنتی مولرین هورمون از واحد های مونومری ۷۰ کیلودالتونی ساخته می شود. هر واحد مونومر شامل ناحیه نارس، پایانه-**N** ۵۵ کیلودالتونی و ناحیه رسیده پایانه-**C** ۱۲/۵ کیلودالتونی می باشد که با اتصال دو زنجیره یکسان به کمک پیوند دی سولفیدی به یکدیگر فرم بیولوژیکی آنتی مولرین هورمون (۱۴۰ کیلودالتونی) تشکیل می شود. ناحیه پایانه-**C** رسیده مسئول فعالیت بیولوژیک **AMH** است، اما برخلاف سایر اعضاء خانواده **TGF-beta** ،در این هورمون، برای فعالیت کامل بیولوژیک ،وجود ناحیه نارس پایانه-**N** ضروری است. به نظر می رسد وجود دومن پایانه-**N** برای حفظ پایداری پروتئین و تاخوردگی ها، لازم باشد. پذیرنده نوع **II** آنتی مولرین هورمون(**AMH RII**) فقط به فرم فعال بیولوژیک **AMH** متصل می شود.

در زنان **AMH** نقش مهمی در فولیکول زایی تخمدانی و حفظ ذخیره فولیکولی طی دوران باروری، ایفا می کند. رشد و نمو فولیکول ها در تخمدان طی دو مرحله مجزا صورت می گیرد، فراخوانی اولیه که منتهی به آغاز رشد فولیکول نخستین شده و فراخوانی دوره ای ، که منتهی به رشد هماهنگ فولیکول های کوچک حفره ای، که از میان آنها فولیکول موردنظر مولد تخمک گزینش می شود، می شود. هورمون محرک فولیکولی (**FSH**) هدایت فرآیند فراخوان دوره ای را برعهده دارد.

بیان **AMH** در سلول های گرانولوزا در فولیکول های اولیه آغاز شده و در سلول های گرانولوزا حاشیه حفره ای و فولیکول های کوچک حفره ای بیان آن بالا باقی مانده و به محض رسیدن قطر فولیکول به حدود ۸ میلیمتر ناگهان تولید آن بشدت کاهش می یابد. کاهش ناگهانی بیان **AMH** مقارن با گزینش فولیکول برای رسیدن و تخمک زایی

است. از این مرحله به بعد رشد فولیکول ها به **FSH** وابسته شده و همزمان فولیکول از حالت تولید استروژن کم به حالت مولد استروژن بالا تبدیل می شود. در این مرحله دیگر **AMH** در فولیکولی که برای تخمک زایی گزینش شده قابل ردیابی نیست. چنین الگویی از بیان **AMH** نقش مهاری **AMH** را در هر دو مرحله مجزای فولیکول زایی به اثبات می رساند. اول اینکه **AMH** انتقال وسیع فولیکول ها را از مرحله نخستین به مراحل بلوغ مهار کرده و از این طریق نقش مهمی را در حفظ تعداد کافی فولیکول های باقیمانده در ذخیره اولیه به منظور حفظ توان باروری طی دوران قبل یائسگی برعهده می گیرد. دوم اینکه **AMH** حساسیت فولیکولی نسبت به **FSH** را کاهش می دهد و در فرآیند گزینش فولیکول برای طی مراحل نهایی بلوغ و تخمک زایی نقش خود را ایفا می کند. سطح **AMH** در سرم نوزاد دختر در هنگام تولد بسیار ناچیز است و پس از بلوغ به حداکثر خود رسیده، و بعد از آن به موازات افزایش سن مستمراً کاهش یافته و در هنگام یائسگی دیگر قابل اندازه گیری نیست. میزان **AMH** طی قاعدگی نسبتاً ثابت بوده و حداکثر نوسانات آن در خانم های جوان مشاهده می شود. سطح **AMH** تغییرات درون دوره ای و بین دوره ای به مراتب کمتری نسبت به **FSH** دارد. متعاقب مصرف ضدبارداری های ترکیبی خوراکی مقدار آن کاهش قابل ملاحظه ای می یابد. اندازه گیری **AMH** کاربردهای بالینی متعددی داشته و اطلاعات حاصل از اندازه گیری آن در شرایط متنوعی بکار می آید. مهمترین کاربرد آن، برآورد ذخیره تخمدانی است که انعکاسی از تعداد فولیکول های حفره ای و حاشیه حفره ای بوده و از آن تحت عنوان "تعداد فولیکول های حفره ای" یا **AFC** یاد می شود. از شاخص **AFC** برای پیش بینی میزان پاسخ به تحریک قابل کنترل تخمدان ها به منظور بکارگیری روش های باروری تسهیل شده نظیر **IVF** استفاده می شود. همچنین اندازه گیری **AMH** در پایش عوارض ناگوار درمان زایی(**Iathrogenic**)، نظیر پرتو درمانی سرطان های حفره شکمی، بر ذخیره تخمدانی کاربرد دارد. از جمله دیگر کاربردهای اندازه گیری **AMH** می توان به تشخیص ناهنجاری های رشد جنسی در اطفال و پایش تومورهای سلول های گرانولوزا برای کشف بیماری برجای مانده یا راجعه، اشاره کرد. همچنین میزان آن درنشانگان تخمدان پلی سیستیک(**PCOS**) که ۵ تا ۱۰٪ زنان را گرفتار می کند، افزایش می یابد. همچنین می توان از اندازه گیری **AMH** برای پیش بینی زمان فرارسیدن یائسگی استفاده کرد.

اساس آزمایش :

کیت سنجش**AMH** شرکت پیشگامان سنجش برمبنای اصول الایزا نوع ساندویچی عمل می کند. نمونه بیمار، کالیبراتور و کنترل به چاهک های پوشیده شده از آنتی بادی علیه **AMH** افزوده شده و پس از یک مرحله انکوباسیون و شستشو، آنتی بادی دوم بیوتینیله علیه **AMH** که نسبت به آنتی بادی فازجامد شاخص های متفاوتی را شناسایی می کند، به مجموعه اضافه می شود . در این مرحله مجموعه ساندویچ "آنتی بادی فازجامد-

AMH- آنتی بادی بیوتینیله** تشکیل می شود. پس از شستشو و خارج کردن اجزاء اتصال نایافته،جهت آشکار سازی واکنش ایمنی سنجی، استرپتاویدین کونژوگه با **HRP** به مجموعه اضافه می گردد که از ناحیه بیوتین به مجموعه بالا متصل می گردد. به دلیل ماهیت بیوتین که هم زمان قادر به اتصال به چندین مولکول استرپتاویدین است، سازوکار یادشده توانمندی تشخیصی(**Detection capability**) را به میزان قابل توجهی افزایش می دهد. درادامه و پس از یک مرحله شستشو با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد. شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود. شدت رنگ با مقدار**AMH** موجود در نمونه نسبت مستقیم دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلرهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.

۲. آب مقطر با هدایت الکتریکی مطلوب کم تر از **1µs/cm**

۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر مرجع.

۴. کاغذ رطوبت گیر

۵. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شست وشو باشد.

نگهداری کیت :

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یادشده پایدار هستند. ***هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه از کیت استفاده نکنید.***

۲. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونه های کنترل بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه های مختلف ساخت تفاوت داشته باشد.

۳. از انجماد اجزاء کیت خودداری نمایید.

۴. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه رطوبت گیر نگهداری شود. در هنگام استفاده پس از رسیدن دمای کیسه میکروپلیت به دمای اتاق، تعداد لازم استریپ را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه رطوبت گیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته و به یخچال منتقل گردد.

۵. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
۶. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.
۷. محلول سوبسترا-رنگ زا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.
۸. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.
۹. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها جلوگیری شود.
۱۰. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه ها استانداردها و کنترل ها ضروری است.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. سرم یا پلاسمای **EDTA** نمونه مناسب برای این آزمایش است.
۲. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحا استفاده نشود.
۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در**C**$^{\circ}$۲۰- سانتیگراد نگهداری شود.
۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد.

احتیاطات و هشدارها

۱. کیت فقط برای تشخیص طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.
۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم AMH سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش AMH در سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.

۳. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را بدقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فراگرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید.

۴. کلیه جوانب ایمنی دراجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروب شناسی وتکنیک های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

۵. از تماس تمام معرف ها به ویژه محلول توقف که حاوی اسید کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.

۶. در این کیت برای ساخت برخی اجزا از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی بادی علیه HIV-1 and 2 و HCV و آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B(HBsAg) ، منفی گزارش شده اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی تواند به طورکامل ایمنی یک نمونه با منشاء انسانی را تضمین نماید، با آن همانند یک نمونه بالقوه عفونی رفتار نمایید.

۷. با کلیه نمونه های بیمار به عنوان نمونه های بالقوه عفونی برخورد نمایید.

۸. برخی از معرف ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزایدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه وارهایی پس ماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۷-۲۰درجه سانتی گراد) برسند.

۲. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ **(20X)** را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداشدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.

۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.

۳. در مواردی که مقدارAMH نمونه بیش از ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر باشد، نمونه را با استاندارد صفر رقیق و سپس آزمایش را تکرار نموده و ضریب رقت را در محاسبه نهایی منظور نمایید.

۴. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.

۵. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا۲۰ تا۲۷ درجه سانتی گراد می باشد.

۶. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.

۷. بهتراست استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی(Duplicate) و ترجیحاً در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورداستفاده قرار گیرد.

۸. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.

۹. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.

۱۰. در کیت AMH شرکت پیشگامان سنجش برای اجتناب از خطای ناشی از اختلاف زمانی پیپتینگ چاهک های ابتدایی با چاهک های پایانی ، به ویژه اگر فرآیند پیپتینگ به صورت دستی انجام می شود، توصیه می شود حداکثر در هر بار آزمایش بیش از ۵ استریپ ران نکنید. استفاده از تجهیزاتی نظیر دیسپنسر اتوماتیک یا سمپلر هشت کاناله برای ریختن معرف ها در مواقعی که تعداد زیادی استریپ هم زمان مورداستفاده قرار می گیرد، باعث اعتبار بیشتر نتایج می گردد. برای اجتناب از رانش نتایج در زمان انکوباسیون سوبسترا، افزودن محلول توقف به چاهک ها بایدمطابق با ترتیب زمانی افزودن محلول سوبسترا-رنگ زا صورت گیرد.

۱۱. در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.

۱۲. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.

۱۳. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت از محیط خارج شوند.

روش انجام آزمایش:

۱- تعداد مناسب چاهک های پوشیده شده از استرپتاویدین، برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار به داخل هر چاهک بریزید.

۳- سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق(**۲۰-۲۷°C**) انکوبه کنید.

۴- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:

- برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهار بار دیگر (جمعاً به مدت ۵ بار) تکرار کنید.در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ جاذب الرطوبه تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
- بهتراست برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک واشر که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

۵- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنتی بادی-بیوتین به تمامی چاهک ها اضافه کنید و پلیت را بمدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمائید.

۶- مطابق با روش مرحله ۵ محتویات چاهک ها را خالی و عمل شستشو را انجام دهید.

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه استرپتاویدین-HRP به تمامی چاهک ها اضافه کنید و پلیت را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمائید.

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

۹- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و پلیت را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۱۰- ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترا- رنگ زا را اضافه نمودید، به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت ۱۰ دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه نتایج:

۱. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها برروی محور عمودی (محور **Y**) و غلظت مشخص آنها برروی محور افقی(محور **X**) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده باشد،ترسیم کنید.

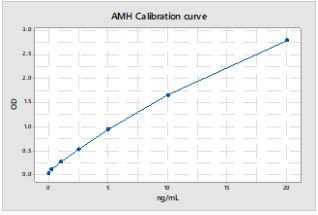
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور **Y** جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور **X** وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۳. در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم پردازش داده های داخلی است استفاده می کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج کیت**AMH** شرکت پیشگامان سنجش از مد محاسباتی نقطه-به-نقطه(**Point-to-point**) استفاده کنید.

داده های نمادین منحنی کالیبراسیون

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل بعنوان داده های نمادین آورده شده است. لازم به یادآوری است این داده ها فقط جنبه راهنمایی داشته و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید براساس نتایج بدست آمده در آزمایشگاه خویش ترسیم نماید.

Row	ng/mL	OD
1	0.0	0.02
2	0.5	0.10
3	1.0	0.26
4	2.5	0.52
5	5.0	0.94
6	10.0	1.65
7	20.0	2.78



کنترل کیفی:

در هر کیت دو نمونه کنترل وجود دارد که مقادیر موردانتظار برای هر یک برروی برچسب ویال درج شده است. علاوه بر کنترل های داخل کیت ، آزمایشگاه می تواند از نمونه های سرم انباشته(**Pooled serum**) که در خود آزمایشگاه تهیه شده یا نمونه های کنترل خارجی نیز استفاده نماید. در دو حالت یادشده لازم به ذکر است که آزمایشگاه باید مقدار هدف ، انحراف معیار نتایج و کرانه های بالایی(**UCL**) و پایینی(**LCL**) قابل قبول را خود محاسبه و مبنای برنامه های کنترل کیفی خویش قرار دهد.

بازه مرجع :

در یک بررسی که برروی سرم تعدادی از مراجعه کنندگان چندین آزمایشگاه مختلف در سطح استان تهران به عمل آمد ، دامنه مرجع زیر برای گروه های مختلف سنی و جنسی براساس درون یابی دامنه بین ٪۲/۵ و ٪۹۷/۵ مرکزی با استفاده از کیت الایزای **AMH** شرکت پیشگامان سنجش بدست آمد. لازم به ذکر است به دلیل تفاوت های بیولوژیک بین جمعیت های مختلف، و همچنین عواملی نظیر سن، جنس، نژاد و عوامل جغرافیایی هر آزمایشگاهی باید ابتدا انتقال پذیری(**transferability**) این داده ها را درخصوص جمعیت موردنظر خویش راستی آزمایی(**Verification**) کرده و درصورت مشاهده ناهمخوانی، 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

همچنین طبق برخی از منابع ، ارتباط بین مقادیر بدست آمده در این کیت و شرایط بالینی بانوان مطابق جدول زیر است :

(**POF**)پایین بودن ذخیره تخمدان	<۰.۳۶
حد پایین ذخیره تخمدان	۰.۳۶-۰.۶۹
محدوده نرمال ذخیره تخمدان	۰.۶۹-۳.۸
حد بالای ذخیره تخمدان	۳.۸-۸.۹

در هر گروه سنی افزایش بالاتر از محدوده مرجع در آن گروه ممکن است که در ارتباط با سندروم پلی سیستیک تخمدان (**PCOS**) باشد.

خصوصیات اجرایی کیت

۱- حد پایینی اندازه گیری(Lower limit of measurement) :

حد شاهد(**Limit-of-Blank: LOB**) و حد آشکار سازی(**Limit-of-detection: LOD**)مطابق با راهنمای **EP 17-A2** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**) بدست آمد.

به طور خلاصه حد بلانک تحت عنوان مقدار صدک ۹۵ ام (**95th percentile**) از ۶۰ بار اندازه گیری برروی نمونه شاهد(استاندارد صفر) طی چندین ران بدست آمد. حد شاهد(**LoB**) معادل غلظتی در نظر گرفته شد که ۹۵٪ از ۶۰ نتیجه اندازه گیری های تکراری مقداری کمتر از آن بدست دهد، مقدار حد شاهد **0.01 ng/mL** بدست آمد.

برای تعیین حد آشکارسازی ۲۰ اندازه گیری تکراری بر روی سه نمونه سرم(۶۰=۳×۲۰=**n**) زنان یائسه با محتوای **AMH**کمتر از **0.05 ng/mL** که مقدار **AMH** آن به روش مستقل دیگری تعیین شده بود طی سه روز انجام شد و بزرگترین انحراف معیار اندازه گیری های تکراری بر روی سه نمونه یادشده مبنای تعیین حد آشکارسازی قرار گرفت. از رابطه زیر حد آشکارسازی پس از گرد کردن روبه بالا معادل **0.03 ng/mL** تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645SD_{Low}$$

۲- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت **AMH** شرکت پیشگامان سنجش و ۳ انباشته سرمی تهیه شده از نمونه های بیمار در نقاط مختلف بازه اندازه گیری(**0.03-20 ng/mL**) مطابق با راهنمای **EP 05-A3** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**) بدست آمد.

طی ۱۰ روزکاری، سه کاربر و هر یک روزانه سه ران اندازه گیری های تکراری به صورت دوتایی در هر ران بروی نمونه های یاد شده انجام دادند(۲×۳×۳×۱۰). نتایج با روش آماری **Fully nested ANOVA** تحلیل گردید: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است

Sample Description	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	0.87	0.048	5.22	0.035	4.02
Patient Pool	1.70	0.06	3.53	0.074	4.35
Patient Pool	6.37	0.34	5.38	0.404	6.34

۳- اختصاصیت(Specificity):

ارزیابی اختصاصیت مطابق با راهنمای **EP 07-A2** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**)، جهت تعیین واکنش متقاطع(**cross reaction**) کیت سنجش **AMH** پیشگامان سنجش با برخی مداخله گرهای متداول صورت گرفت. نمونه های حاوی واکنشگرهای متقاطع از طریق **spike** کردن سرم انسانی طبیعی با مواد حاوی سطوح بالایی از همان واکنشگرها به گونه ای که ماتریکس سرم بیش از ۱۰ درصد تغییر نکند،تهیه شد. سپس مقدار **AMH** همزمان در یک ران در نمونه هایی که با ماتریکس بی اثر **spike** شده بودند و نمونه هایی که با واکنشگرهای متقاطع **spike** شدند، اندازه گیری شد و مقدار واکنش پذیری متقاطع هر نمونه از رابطه زیر محاسبه شد و به صورت نسبت به غلظت **AMH** اولیه بیان گردید. نتایج در جدولی که در ادامه می آید خلاصه شده است:

$$\%\mathbf{cross-reactivity} = \frac{\boldsymbol{mean\ conc.of\ spiked\ sample - mean\ conc.of\ unspiked\ sample}}{\boldsymbol{spiked\ conc.}} \times \mathbf{100}$$

نوع ماده	غلظت	درصد تداخل(٪)
hLH	100 mIU/mL	0.04
hFSH	100 mIU/ml	0.06
TGF β1	100 ng/mL	0.06
Activin A	100 ng/mL	0.07
Inhibin A	20 ng/mL	0.04

همچنین بیلی روبین غیرکونژوگه تا **20 mg/dL**، تری گلیسریدها تا **1000 mg/dL** و هموگلوبین تا **50 mg/dL** در سنجش **AMH** سرم با کیت پیشگامان تأثیری برسنجش ندارد(**10%≥interference%**).

۴- خطی بودن(Linearity):

به منظور ارزیابی خطی بودن یک نمونه با غلظت اولیه**18.5 ng/mL** را با نمونه دیگری با غلظت **0.07 ng/mL** به نسبت های مختلف با یکدیگر رقیق کردیم و رقت های مختلف را به صورت مضاعف اندازه گیری ونتایج را با مقادیر موردانتظار که از ضرب غلظت اولیه در ضریب رقت بدست آمده بود مقایسه کردیم و میزان بازیابی و سوگرایی را در نقاط مختلف محاسبه کردیم، که نتایج در جدول زیر خلاصه شده است.

No.	Ratio	Expected (ng/mL)	Rep 1 (ng/mL)	Rep 2 (ng/mL)	recovery%	%Bias
1	1	18.50	18.2	18.8	NA	NA
2	0.9	16.66	17.3	17.5	104%	4.5%
3	0.8	14.81	16.4	16.5	111%	11.0%
4	0.7	12.97	14	13.5	106%	6.0%
5	0.6	11.13	12.4	11.9	109%	9.2%
6	0.5	9.28	9.5	8.7	98%	-2.0%
7	0.4	7.44	6.9	7.5	97%	-3.2%
8	0.3	5.60	5.5	5.2	96%	-4.4%
9	0.2	3.75	3.1	3.9	93%	-6.8%
10	0.1	1.91	1.8	1.75	93%	-7.1%
11	0	0.07	0.047	0.087	NA	NA

NA: کاربردی ندارد.

۵- درستی(Trueness):

۵-۱- ارزیابی بازیابی(Recovery Evaluation)

ارزیابی خطای سیستماتیک یا بایاس روش به دو صورت انجام گرفت. ابتدا میزان خطای سیستماتیک نسبی(**Proportional Error**) از طریق مطالعات بازیابی و با افزودن مقادیر مشخص از **AMH** انجام گرفت. به طور خلاصه نمونه اولیه به دو بخش مساوی تقسیم و به یکی حجمی از سرم یا بالاترین استاندارد حاوی مقدار مشخص**AMH** به دیگری همان حجم استاندارد صفر به گونه ای که ماتریکس نمونه بیش از ۱۰ درصد تغییر نکند افزوده شد. و سپس بررسی توانمندی سیستم اندازه گیری درتشخیص مقدار افزوده شده از طریق رابطه زیر محاسبه گردید

$$\%\boldsymbol{Recovery} = \frac{\boldsymbol{Concentration\ Recovered}}{\boldsymbol{Concentration\ Added}} \times \mathbf{100}$$

همچنین مقدار خطای سیستماتیک که به زبان ریاضی با بیان می گردد، از رابطه زیر بدست آمد:

$$\%\boldsymbol{Bias} = \frac{\boldsymbol{\bar{X}\ measured - expected}}{\boldsymbol{Expected}} \times \mathbf{100}$$

در ارزیابی پیش رو از بالاترین استاندارد کیت به عنوان منبع آنالیت استفاده شد و مقدار بازیابی در ۶ سطح غلظتی ارزیابی شد. نتایج این ارزیابی در جدول زیر خلاصه شده است:

Sam. No	Base Conc. ng/mL	Added Analyte	Rep 1 ng/mL	Rep 2 ng/mL	Bias	Recovery
1	0.045	10 ng/mL	10.18	9.35	-2.79%	97.20%
2	1.15		12.31	10.54	2.47%	102.75%
3	2.7		11.68	11.87	-7.28%	90.75%
4	4.5		13.74	13.64	-5.59%	91.90%
5	5.6		15.45	16.45	2.24%	103.50%
6	7.2		17.53	18.47	4.65%	108.00%

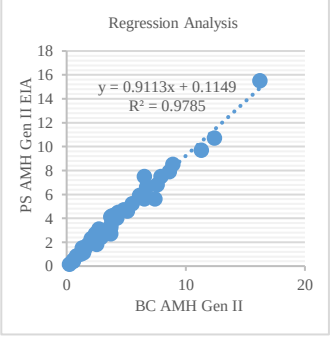
۲-۵- ارزیابی مقایسه ای(Method comparison)

ارزیابی مقایسه ای بین نتایج اندازه گیری کیت سنجش **AMH** سرم شرکت پیشگامان و روش **BECKMAN COULTER AMH Gen II**(**n=89 range:0.07-18.5 ng/mL**) انجام مطابق با راهنمای **EP 09-A2** مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(**CLSI**) به روش رگرسیون خطی تحلیل گردید. خلاصه نتایج و نمودار رگرسیون خطی در ادامه آورده شده است:

$$PSI\ ELISA = 0.9113\ BC + 0.1149$$

$$r = 0.9892$$

$$r^2 = 0.9785$$



٦- پدیده هوک:

در این کیت پدیده هوک تا غلظت**2000 ng/mL** مشاهده نگردید.

منابع و مراجع:

1. CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.

2. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.

3. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.

4. Helen Mason. et al. (2014). The Physiology and clinical utility of anti-Mülerian hormone in women. Human Reproduction update. 0(0) pp 1-16

5. Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. Elsevier Inc. 1644

6. Scott M.G. et al. (1989). Hormonal evaluation of female infertility and reproductive disorders. Clin. Chem. 1989. 35:620-3

خطایابی در آزمایش های الایزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها	افت و یا آلودگی کونژوگه	تکرار تست با کونژوگه جدید
	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	۱.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. ۲.قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱.PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	۱.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. ۲.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (۴۰۵ nm بجای ۴۵۰ nm)	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.
	پیپتینگ نامناسب	۱.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. ۳.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.

		٤.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱ . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استاندارد های جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	۱.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲. تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. ۳.از فیلتر ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.
	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
عدم تولید رنگ در چاهک ها	استفاده از مواد سایر کیت ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول رنگزا	تکرار تست با محلول رنگزا جدید
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید

عدم تکرار پذیری مناسب	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید ۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. ٤. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. ٥. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. ٦. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها
	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها	پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهکها	کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول های کیت	قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.

INTENDED USE

For the quantitative determination of **Anti-Müllerian Hormone (AMH) or Müllerian-inhibiting hormone(MIH)** concentration in human serum or plasma.

CLINICAL SIGNIFICANCE

AMH is a glycoprotein belonging to a family of growth and differentiation factors called transforming growth factor beta and has been primarily known for its role in male sexual differentiation. All members of this superfamily are involved in the regulation of tissues growth and differentiation. During male fetal differentiation, it is produced by Sertolli cells in testis and is responsible for regression of Müllerian ducts during male fetal sex differentiation. Secretion of AMH by Sertolli cells starts during embryogenesis and continues throughout the life.

AMH is produced as a precursor protein, consisting of 70 KDa monomers. Proteolytic cleavage yields a 55 KDa N-terminal proregion and a 12.5 KDa C-terminal mature region. The pro- and mature homodimers remain non-covalently associated, resulting in a 140 KDa complex in circulation. The mature region of AMH holds the biological activity of the protein, but in contrast to other TGF-β family members, requires the N-terminal proregion to obtain its full activity. It has been suggested that the proregion is involved in protein stability and folding. AMH Type II receptor can only bind to biologically active form of AMH.

In females, AMH plays an important role in the ovarian folliculogenesis. Follicle development in the ovaries comprises two distinct stages: initial recruitment, by which primordial follicles start to mature, and cyclic recruitment, which leads to harmonized growth of small antral follicles, one of them is then selected to ovulate. Cyclic recruitment is under the control of FSH.

AMH expression in granulosa cells starts in primary follicles and in preantral and small antral follicles remains high until a follicle diameter reaches a dimeter of around 8 mm. A sharp decline in AMH expression which is seen around 8 mm corresponds to selection of follicle for dominance. This pattern of AMH expression indicates inhibitory role of AMH at two distinct stages of folliculogenesis. First, AMH blocks the transition of follicles from primordial into maturation stages and so plays an important role in regulating the reservoir of primordial follicles. Second, AMH decreases follicle sensitivity to FSH and therefore has a role in the process of follicular selection.

Serum levels of AMH are rarely detectable at birth in females, reach their highest levels after puberty, decrease progressively thereafter with age, and become undetectable at menopause. Serum AMH levels are relatively stable through menstrual cycle with substantial fluctuations being observed in younger women. Serum AMH levels decrease significantly during the use of combined contraceptives.

Serum AMH determination has a great variety of clinical applications. It is mainly used for estimation of ovarian reserve indicating the number of antral and pre-antral follicles, (an index called antral follicle count or AFC). It provides useful information regarding ovarian follicular status and responsiveness to controlled ovarian hyperstimulation. AMH measurement is also used for monitoring of iatrogenic complications such as effects of radiotherapy, chemotherapy and surgery on ovarian reserve. Diagnosis of disorders of sex development in children and monitoring of granulosa cell tumors to detect remaining or recurrent disease are further clinical applications of AMH measurement. AMH increases in polycystic ovary syndrome (PCOS) which affects 5-10% of women. AMH is a good marker for predicting time to menopause.

PRINICPLES OF THE METHOD

The PSI AMH second generation ELISA kit is a solid-phase, non-competitive immunoassay based upon the direct sandwich technique. In the first step calibrators, controls and patient samples are incubated in a monoclonal anti-AMH coated plate. Strips are then washed to remove unbound matrix. At the next step a biotinylated detection antibody which recognizes AMH from different region is added to each well. After incubation and washing HRP-conjugated streptavidin is added to each well.
During these phases, a complex consisting of solid phase capture Ab-AMH-detection biotinylated antibody-HRP conjugated streptavidin is formed. The strips are then washed and, buffered substrate/chromogen reagent (hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine) is added to each well and the enzyme reaction is allowed to proceed. During the enzyme reaction, a blue color will develop and the intensity of the color is directly proportional to the amount of AMH present in the samples.

REAGENTS PROVIDED

Reagent	Quantity/48 Test KIT	Quantity/96 Test KIT	Reconstitution
Microplate (96 breakable wells) coated with monoclonal anti-AMH	48 wells	96 wells	Ready to Use
Calibrators 1-7 (0, 0.2, 1.0, 2.5, 5.0, 10 and 20 ng/mL) in buffer, containing preservative	7 Vial/1.0 ml	7 Vial/1.5 ml	Ready to Use
Control serum in buffer compatible with human serum matrix with preservatives	2 Vial/1.0 ml	2 Vial/1.5 ml	Ready to Use
Biotin-Reagent(Blue color)	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/12.0 ml	Ready to Use
Conjugate-Reagent(Red color)	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/12.0 ml	Ready to use
Concentrated Wash solution	1 Vial/30ml	1 Vial/30 ml	Dilute 1:20 with distilled water
Substrate-Chromogenic solution (Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide)	1 Vial/6.0ml	1 Vial/12ml	Ready to Use
Stop solution (H2So4 0.12M) Additional information about the other additive is considered proprietary.	1 Vial/6.0 ml	1 Vial/6.0 ml	Ready to Use

Materials required but not supplied with kit

The following materials are required but not provided in the kit:

- Distilled water with conductivity < 1µS/cm
- Precise micropipettes for delivery of 50, 100 microliters. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 50-200 µL is useful but not essential.
- Pipettes for dispensing milliliter volumes.
- Vortex mixer
- Automatic washer or any other device which can deliver 350 microliter wash solution for microplates

- Microplate reader with a wavelength of 450 nm and 620-650 nm, and an absorbance range of 0-3.0

STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- If kept at 2-8 °C, before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date as indicated on their label.
- Calibrators concentration is displayed on the vial labels and may vary between lots.
- Do not freeze kits.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the preparation day.
- Each lot of reagents and calibrators has been standardized to produce the correct reaction. Do not interchange the reagents or calibrators between lots.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration. Chromogenic solution TMB should be colorless. Blue color indicates that the reagent has been contaminated and should be discarded.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Human serum and EDTA plasma are samples of choice for PSI AMH kit.
- Do not use grossly haemolysed or turbid samples.
- If the measurement cannot be done within 24 hours after sample collection, samples should be kept at 2-8°C up to 48 hours. For longer storage serum or plasma must be stored at -20°C.
- Avoid repeated freeze and thaw cycles. Frozen specimens must be gently but thoroughly mixed after thawing.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

- For professional in vitro diagnostic use only.
- All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of AMH in human serum. The kit is not calibrated for the determination of AMH in Non-EDTA plasma or other specimens of human or animal origin.
- Before starting the assay, read the working manual completely and carefully. Use the valid version of the instruction provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- Please refer to the U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., USA) publication No (CDC) 88—8_95 on laboratory safety procedures or any other local or national regulation.
- Handle all patient specimens as potentially infectious.
- Reagents contain sodium azide (NaN3) as a preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. Follow local guidelines for disposal of all waste material.
- Avoid any skin contact with all reagents. Stop solution contains strong acid in case of contact, wash thoroughly with soap and water.

Caution

Material used in the preparation of human source reagents has been tested and found to be non-reactive for HIV 1 & 2 antibodies, HCV antibody and hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Since no method can completely rule out the presence of blood borne diseases, the handling and disposal of human source reagents from this product should be made as if they are potentially infectious.

Preparation of reagents

Wash Buffer:

According to the required volume, pour the desired volume of wash concentrate into a clean container and dilute 20 fold by adding adequate volume of distilled or deionized water to gain buffered Wash Solution. E.g. 10 mL wash concentrate to 190 mL distilled water. Wash solution should be prepared daily and discard unused working wash solution at the end of the day.

HANDELING NOTES

1. Do not use the kit or components beyond the expiry date.
2. Do not mix up vial caps.
3. Bring all the reagents to room temperature prior to use.
4. Thoroughly mix all reagents, calibrators/controls and samples by gentle agitation or swirling.
5. Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
6. Use a clean container and high-quality distilled or deionized water to prepare the working wash solution.
7. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for addition of each reagent and sample.
8. For the dispensing of Chromogenic solution and Stop solution, avoid pipettes with metal parts.
9. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
10. Adhere the incubation times carefully. Tolerance limit of incubation time is ±5%
11. To avoid drift, arising from incubation time difference between first and last well, it is strongly recommended not to run more than six strips when pipetting manually (Time delay).
12. Perform all steps consecutively without any delay. Any delay in each step has deleterious effects on final results.
13. Draw a calibration curve for each run, do not use stored curve from previous runs.
14. Incubation with Chromogenic solution, must be done in the dark.
15. Only standard 0 may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
16. Opened reagents are stable maximally for 8 weeks if they are not contaminated, and stored in resealed original containers and handled as prescribed. Return to 2-8°C immediately after use.

Measurement Procedure

1. Transfer the required number of microplate strips to a strip frame. (Immediately return the remaining strips to the aluminum pouch containing a desiccant, reseal carefully and store at 2-8°C.
2. Pipette 100 µL of each Calibrator (calibrators 0, 0.2, 1.0, 2.5, 5.0, 10 & 20 ng/mL), controls and patient samples in duplicate into the appropriate wells.

3. Cover the plate with an adhesive seal and incubate for 60 minutes at room temperature (20-27°C).
4. Wash the plate according to procedure below.
    i. Carefully dispense 350 µL of working wash solution into each well.
    ii. Aspirate the content of each well.
    iii. Repeat 4 additional wash for a total of 5 wash cycles.
    iv. After the last wash cycle invert the plate and tap it carefully against an absorbent paper.

Note: Automatic strip washer: Follow the manufacturer's instructions for maintenance and wash the required number of wash cycles.

5. Add 100 µL of Biotin-regent to each well and incubate for 30 minutes at room temperature (20-27°C).
6. Wash the strips as described in procedural note 4.
7. Add 100 µL of conjugate-regent to each well and incubate fo15 minutes at room temperature (20-27°C).
8. Wash the strips as described in procedural note 4.
9. Add 100 µL of Chromogenic solution TMB to each well. The Chromogenic solution TMB should be added to the wells as quickly as possible.
10. Incubate for 15 min at room temperature preferentially in the dark.
11. Add 50 µL of Stop Solution, mix and read the absorbance at 450 nm (with a reference filter 620, 630, or 650 nm) in a microplate spectrophotometer within 10 min after addition of Stop Solution.

Important Note: *always add stop solution in the same order as chromogenic solution TMB.*

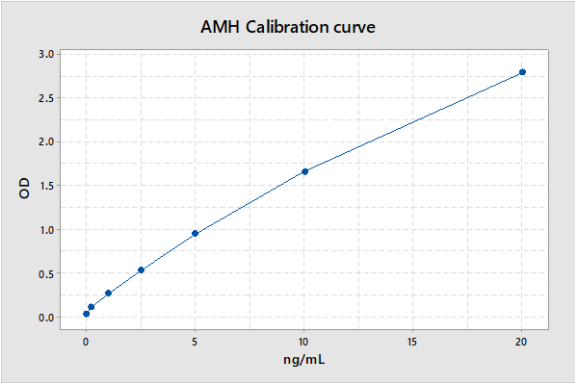
CALCULATION OF RESULTS

1. Construct a calibration curve by plotting the average O.D. (450 nm) for each calibrator on the vertical (Y) axis against the concentration on the horizontal (X) axis, and draw the best fit curve through the points on the graph.
2. To determine concentration of AMH in each sample, first locate the O.D. value on the Y-axis and extend a horizontal line to the calibration curve. At the point of intersection, draw a vertical line to the X-axis and read the corresponding concentration.
3. If a microplate spectrophotometer with built-in data calculation program is used, refer to the manual for the spectrophotometer and create a program using the concentration stated on the label of each calibrator. For automatic calculation of AMH results, it is recommended to use point-to-point method.

Typical Data

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real-time calibration curve.

Row	OD	ng/mL
1	0.02	0.0
2	0.10	0.2
3	0.26	1.0
4	0.52	2.5
5	0.94	5.0
6	1.65	10.0
7	2.78	20.0



Quality control

AMH control serum should be used for validation of the assay series. Range of expected results are indicated on the vial label. If assigned range is not obtained, a complete check of reagents and reader performance should be made and the assay shall be repeated. Each laboratory can also prepare its own serum pools at different levels, which can be used as internal controls in order to ensure the precision of the assay.

Expected values

A study with PSI AMH EIA kit was performed using samples from some apparently healthy people from different sex and age groups following reference interval corresponding to 2.5th and 97.5th percentiles of results was extrapolated. Each laboratory should first investigate the transferability of the recommended expected value to its own patient population and if it doesn't match, determine its own reference interval:

Age group	Median(ng/mL)	2.5-97.5th percentile (ng/mL)
Males(>12 years)	**5.7**	**0.7-19**
Boys(24 mo-12 y)	**60**	**7.4-243**
Females(13-45 years)	**2.4**	**1.0-4.0**
Girls(24 mo-12 y)	**1.3**	**<8.9**
Girls(<24 mo)	**-**	**<4.7**
Females(diminished ovarian reserve)	**-**	**<1.0**
Females(Post-Menopausal)	**-**	**ND**

PERFORMANCE CRITERIA

1. **Lower limit of measurement:**

The Limit of Blank and Limit of Detection were determined according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A2 guideline.

In brief, Limit of Blank was determined as the 95th percentile value from n = 60 measurements on standard 0 over several runs. The Limit of blank equals to the concentration that 95% of the repeated measurements on zero standard give value below it. In the next step, we determined standard deviation of the repeated measurements on 3 samples with AMH contents less than 0.2 ng/mL determined from a separate method study (ECLIA Method). By adding the LOB calculated at 1st step to 1.645 times the greatest standards deviation calculated in the 2nd step ($LOD = LOB + 1.645SD_L$) LOD calculated as 0.03 ng/mL.

2. Precision:

Precision was determined using PSI AMH kit reagents and three pooled human sera according to EP05-A3 Guideline.

Three runs per day (morning, midday and afternoon) by 3 user in 10 working days($10 \times 3 \times 3$). Results analyzed by fully nested ANOVA. Following results were obtained:

Sample Description	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool	**0.87**	**0.048**	**5.22**	**0.035**	**4.02**
Patient Pool	**1.70**	**0.06**	**3.53**	**0.074**	**4.35**
Patient Pool	**6.37**	**0.34**	**5.38**	**0.404**	**6.34**

3. Specificity:

Specificity evaluation was performed according to guideline CLSI EP07-A2 to assess the cross-reactivity of the assay with common cross-reactants usually encountered in human serum. Samples containing cross-reactants was prepared by spiking natural human sera with material containing high levels of cross-reactants. The modification of serum matrix was no more than 10%. The % cross-reactivity was calculated for each sample using the equation below and normalized to the AMH content:

$$\%cross-reactivity = \frac{mean\ conc.of\ spiked\ sample - mean\ conc.of\ unspiked\ sample}{spiked\ concentration} \times 100\%$$

The results are summarized in the following table:

Cross reactants	Concentration	Interference%
hLH	**100 mIU/mL**	**0.04**
hFSH	**100 mIU/mL**	**0.06**
TGF β1	**100 ng/mL**	**0.06**
Activin A	**100 ng/mL**	**0.07**
Inhibin A	**20 ng/mL**	**0.04**

PSI AMH Gen II ELISA measurement method is unaffected by icterus (Bilirubin up to 40 mg/dL) Lipemia (Intralipid up to 1000 mg/dL) and hemolysis (Hb up to 50 mg/mL)

4. Linearity

Evaluation of Linearity was performed according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP 06-A guideline

In brief, a sample with concentration of 18.5 ng/mL AMH as a high sample was diluted with another sample with 0.07 ng/mL in different proportions and their AMH was measured in duplicate on each dilution. Measured values were compared with expected values which were estimated by dilution formula, then % bias and %recovery were calculated for each concentration. The following results are obtained:

No	Ratio	Expected (ng/mL)	Rep 1 (ng/mL)	Rep 2 (ng/mL)	recovery%	%Bias
1	**1**	18.50	18.2	18.8	**NA**	**NA**
2	**0.9**	16.66	17.3	17.5	104%	4.5%
3	**0.8**	14.81	16.4	16.5	111%	11.0%
4	**0.7**	12.97	14	13.5	106%	6.0%
5	**0.6**	11.13	12.4	11.9	109%	9.2%
6	**0.5**	9.28	9.5	8.7	98%	-2.0%
7	**0.4**	7.44	6.9	7.5	97%	-3.2%
8	**0.3**	5.60	5.5	5.2	96%	-4.4%
9	**0.2**	3.75	3.1	3.9	93%	-6.8%
10	**0.1**	1.91	1.8	1.75	93%	-7.1%
11	**0**	0.07	0.047	0.087	**NA**	**NA**

NA: Not applicable

5. Trueness:

5.1. Recovery Evaluation (Proportional error)

Recovery was assessed by adding 10 ng/mL (using standard 20 ng/mL as source of analyte) of AMH to six samples with different AMH contents. Then % recovery and % bias was calculated for each sample using the equations below:

$$\%Recovery = \frac{Concentration\ Recovered}{Concentration\ Added} \times 100$$

$$\%Bias = \frac{\bar{X}\ measured - expected}{Expected} \times 100$$

The results are summarized in the following table:

Sam. No	Base Conc. ng/mL	Added Analyte	Rep 1 ng/mL	Rep 2 ng/mL	Bias	Recovery
1	0.045	10 ng/mL	10.18	9.35	-2.79%	97.20%
2	1.15		12.31	10.54	2.47%	102.75%
3	2.7		11.68	11.87	-7.28%	90.75%
4	4.5		13.74	13.64	-5.59%	91.90%
5	5.6		15.45	16.45	2.24%	103.50%
6	7.2		17.53	18.47	4.65%	108.00%

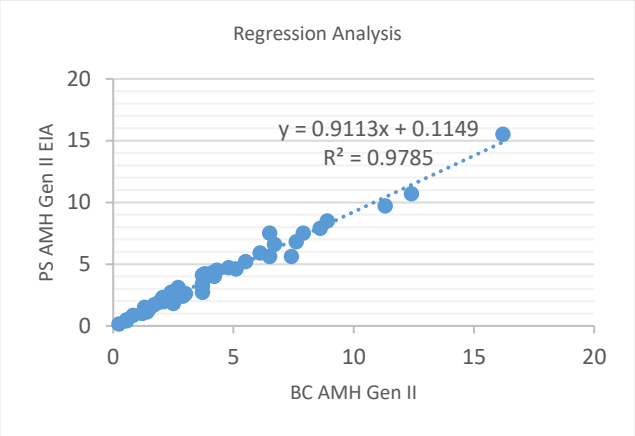
5.2. Method comparison:

A comparison of the PSI AMH Gen II ELISA kit (y axis) using patient samples (**n=89 range:0.07-18.5ng/mL**) with **EIA BECKMAN COULTER AMH Gen II** (X axis) gave the following results by ordinary linear regression:

$$PSI\ \ EIA = 0.9113\ \ BC + 0.1149$$

$$r = 0.9892$$

$$r^2 = 0.9785$$



6. High dose hook effect

In PSI AMH Gen II ELISA kit, high dose hook effect has not been seen up to 2000 ng/mL.

References:

1. **CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP 17-A2. Pierson-Perry J.F. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.**
2. **CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.**
3. **CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.**
4. **Helen Mason. et al. (2014). The Physiology and clinical utility of anti-Mülerian hormone in women. Human Reproduction update. 0(0) pp 1-16**
5. **Rifai Nader. et al. (2018). Clinical chemistry and molecular diagnostics.6th ed. Elsevier Inc.pp 1644**
6. **Scott M.G. et al. (1989). Hormonal evaluation of female infertility and reproductive disorders. Clin. Chem. 1989. 35:620-30**

Procedure in-brief