

Instructions for use
Pregnenolone ELISA

Please use only the valid version of the Instructions for use provided with the kit

REF**FR E-2700****IVD****CE**

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of Pregnenolone by an enzyme immunoassay in human serum.
For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabelled antigen (present in standards, controls and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microplate. The washing and decanting procedures remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of pregnenolone in the sample. A set of standards is used to plot a standard curve from which the concentration of pregnenolone in patient samples and controls can be directly read.

CLINICAL APPLICATIONS

Pregnenolone (3 β -hydroxypregn-5-en-20-one) is the first steroid to be derived from cholesterol in the pathway of steroidogenesis, and it is the common precursor for all of the adrenal and gonadal steroids. Its production occurs in the mitochondrion by cleavage of the C-20 side chain of cholesterol by the P-450SCC enzyme. Once produced, pregnenolone may be utilized by two pathways of steroidogenesis. Pregnenolone may either be converted to 17-OH pregnenolone via the enzymatic action of 17 α -hydroxylase, or to progesterone via the enzymatic action of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase.

Elevated pregnenolone levels occur in forms of congenital adrenal hyperplasia (CAH), due to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency or 17 α -hydroxylase deficiencies. Higher levels have also been reported in women with idiopathic hirsutism. Studies on pregnenolone levels in regard to sex and age differences indicate that maximum levels occur at approximately 17 and 16 years of age for women and men, while minimum levels occur at approximately 37 and 38 years of age for women and men, respectively. In general, women were found to have slightly higher values when compared to men.

Many areas of pregnenolone physiology remain to be investigated. Current research indicates that the determination of pregnenolone in serum may be useful for studying its metabolite, pregnenolone sulfate, which has been reported to have various effects in the mammalian brain and central nervous system.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. It is recommended to all customers to prepare their own control materials or serum pools that should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. A standard curve must be established for every run.
7. The controls provided in the kit should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the controls do not reflect established ranges.
9. When reading the microplate, the presence of bubbles in the wells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
10. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
11. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
12. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, standard and control.
13. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
14. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of pregnenolone in human serum. The kit is not calibrated for the determination of pregnenolone in saliva, plasma or other specimens of human or animal origin.
2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
3. Any samples or control sera containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
4. Only Standard A may be used to dilute any high serum samples.
The use of any other reagent may lead to false results.
5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals / products if false results are suspected.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the standards and controls has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. No test method however, can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.2 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4 - 5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4 °C for up to 24 hours or at -10 °C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

SPECIMEN PRETREATMENT

This assay is a direct system; no specimen pretreatment is necessary.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipettes to dispense 50, 100, 150 and 300 µl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Plate shaker
5. Microplate reader with a filter set at 450 nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 10)

REAGENTS PROVIDED

- 1. AA E-0030** **WASH CONC 10x** **Wash Buffer Concentrate – X10**
Contents: One vial containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
Volume: 50 ml/vial
Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
Stability: 12 months or as indicated on label.
Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of water.
- 2. AA E-0055** **SUBSTRATE** **TMB Substrate - Ready To Use**
Contents: One vial containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.
Volume: 16 ml/vial
Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
Stability: 12 months or as indicated on label.

3. AA E-0080 **STOP-SOLN** **Stopping Solution** - Ready To Use

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.
 Volume: 6 ml/vial
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
 Stability: 12 months or as indicated on label.
 Hazards identification:



H290 May be corrosive to metals.
 H314 Causes severe skin burns and eye damage.

4. Standards and Controls - Ready To Use

Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations:

| Cat. no. | Symbol | Standard | Concentration | Volume/Vial |
|------------------|-------------------|------------|--|-------------|
| FR E-2701 | STANDARD A | Standard A | 0 ng/ml | 2.0 ml |
| FR E-2702 | STANDARD B | Standard B | 0.1 ng/ml | 0.5 ml |
| FR E-2703 | STANDARD C | Standard C | 0.4 ng/ml | 0.5 ml |
| FR E-2704 | STANDARD D | Standard D | 1.6 ng/ml | 0.5 ml |
| FR E-2705 | STANDARD E | Standard E | 6.4 ng/ml | 0.5 ml |
| FR E-2706 | STANDARD F | Standard F | 25.6 ng/ml | 0.5 ml |
| FR E-2751 | CONTROL 1 | Control 1 | Refer to vial labels for acceptable range! | 0.5 ml |
| FR E-2752 | CONTROL 2 | Control 2 | | 0.5 ml |

Contents: Pregnenolone in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of pregnenolone.
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
 Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the standards should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

5. FR E-2713 **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** - Ready To Use

Contents: One vial containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
 Volume: 15 ml/vial
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
 Stability: 12 months or as indicated on label.

6. FR E-2731 **96** **Rabbit Anti-Pregnenolone Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells** - Ready To Use

Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microplate in a resealable pouch with desiccant.
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
 Stability: 12 months or as indicated on label.


7. FR E-2740 **CONJUGATE-CONC 50x** **Pregnenolone-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate** - X50

Contents: Pregnenolone-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
 Volume: 300 µl/vial
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
 Stability: 12 months or as indicated on label.
 Preparation: Dilute 1:50 in assay buffer before use (eg. 40 µl of HRP in 2 ml of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 240 µl of HRP in 12 ml of assay buffer. Discard any that is left over.

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment: **None.**

All reagents must reach room temperature before use. Standards, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

| | |
|------------|--|
| 1. | Prepare working solutions of the pregnenolone-HRP conjugate and wash buffer . |
| 2. | Remove the required number of well strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator. |
| 3. | Pipette 50 µl of each standard, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate. |
| 4. | Pipette 100 µl of the conjugate working solution into each well. <i>(We recommend using a multichannel pipette).</i> |
| 5. | Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for 1 hour at room temperature . |
| 6. | Wash the wells 3 times with 300 µl of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry <i>(The use of a washer is recommended).</i> |
| 7. | Pipette 150 µl of TMB substrate into each well. |
| 8. | Incubate on a plate shaker for 10 - 15 minutes at room temperature <i>(or until Standard A attains dark blue colour for desired OD).</i> |
| 9. | Pipette 50 µl of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 7. |
| 10. | Read the plate on a microplate reader at 450 nm within 20 minutes after addition of the stopping solution.  <i>If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450nm filter is unavailable, a 405 or 415nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient / control samples.</i> |

CALCULATIONS

1. Calculate the mean optical density of each standard duplicate.
2. Draw a standard curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the standard concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the standard curve.
5. If a sample reads more than 25.6 ng/ml then dilute it with Standard A at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

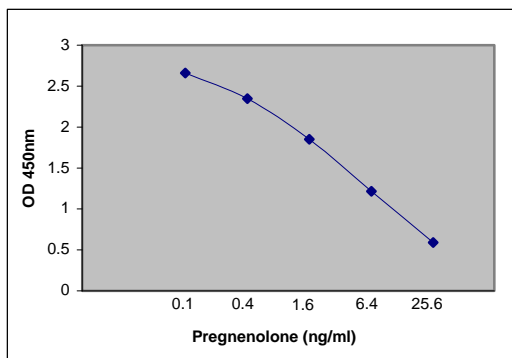
TYPICAL TABULATED DATA

Sample data only. **Do not** use to calculate results.

| Standard | OD 1 | OD 2 | Mean OD | Value (ng/ml) |
|----------|-------|-------|---------|---------------|
| A | 2.891 | 2.808 | 2.850 | 0 |
| B | 2.613 | 2.651 | 2.632 | 0.1 |
| C | 2.350 | 2.343 | 2.347 | 0.4 |
| D | 1.823 | 1.879 | 1.851 | 1.6 |
| E | 1.237 | 1.197 | 1.217 | 6.4 |
| F | 0.589 | 0.594 | 0.591 | 25.6 |
| Unknown | 1.431 | 1.451 | 1.441 | 4.0 |

TYPICAL STANDARD CURVE

Sample curve only. **Do not** use to calculate results.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the standard curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Standard A (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the Pregnenolone ELISA kit is **0.05 ng/ml**.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the Pregnenolone ELISA kit with pregnenolone cross-reacting at 100%.

| Steroid | % Cross Reactivity |
|---------------------------|--------------------|
| Pregnenolone | 100 |
| Progesterone | 6.0 |
| Dehydroisoandrosterone | 5.2 |
| 5 α -Androstandiol | 4.7 |
| Epiandrosterone | 1.0 |
| Pregnenolone Sulfate | 0.4 |
| Androstandione | 0.3 |
| 5 α -Androsterone | 0.3 |
| DHEAS | 0.2 |
| Etiocholanolone | 0.1 |

The following steroids were tested but cross-reacted at less than 0.1 %: Adrenosterone, Aldosterone, Androstenedione, Cholesterol, Corticosterone, 5 α -DHT, 17 β -Estradiol, Estriol and Testosterone.

INTRA-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times each on the same standard curve. The results (in ng/ml) are tabulated below:

| Sample | Mean | SD | CV % |
|--------|------|------|------|
| 1 | 0.19 | 0.02 | 10.6 |
| 2 | 1.04 | 0.85 | 8.2 |
| 3 | 4.77 | 0.37 | 7.8 |

INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times over a period of four weeks. The results (in ng/ml) are tabulated below:

| Sample | Mean | SD | CV % |
|--------|------|------|------|
| 1 | 0.22 | 0.03 | 14.5 |
| 2 | 1.14 | 0.14 | 12.3 |
| 3 | 4.56 | 0.44 | 9.6 |

RECOVERY

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of pregnenolone to four patient serum samples. The results (in ng/ml) are tabulated below:

| Sample | Obs. Result | Exp. Result | Recovery % |
|----------------------|--------------|-------------|------------|
| 1 Unspiked + 4.14 | 0.37 5.31 | - 4.51 | - 117.7 |
| 2 Unspiked + 4.01 | 0.77 5.69 | - 4.78 | - 119.0 |
| 3 Unspiked + 3.98 | 0.85 5.18 | - 4.83 | - 107.2 |
| 4 Unspiked + 3.78 | 1.47 6.31 | - 5.25 | - 120.2 |

LINEARITY

Three patient serum samples were diluted with Standard A. The results (in ng/ml) are tabulated below:

| Sample | Obs. Result | Exp. Result | Recovery % |
|--------|-------------|-------------|------------|
| 1 | 5.31 | - | - |
| 1:2 | 2.89 | 2.66 | 108.6 |
| 1:4 | 1.26 | 1.33 | 94.7 |
| 1:8 | 0.71 | 0.66 | 107.6 |
| 2 | 6.51 | - | - |
| 1:2 | 2.75 | 3.26 | 84.4 |
| 1:4 | 1.54 | 1.63 | 94.5 |
| 1:8 | 0.80 | 0.81 | 98.8 |
| 3 | 8.34 | - | - |
| 1:2 | 3.78 | 4.17 | 90.6 |
| 1:4 | 2.15 | 2.09 | 102.9 |
| 1:8 | 1.05 | 1.04 | 101.0 |

EXPECTED NORMAL VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.







| Group | N | Mean (ng/ml) | Abs. Range (ng/ml) |
|---------|----|--------------|--------------------|
| Males | 30 | 0.50 | 0.1 - 3.4 |
| Females | 50 | 0.55 | 0.1 - 3.8 |

REFERENCES

1. Abraham GE, et al. Radioimmunoassay of Plasma Pregnenolone, 17-hydroxy-pregnenolone and Dehydroepiandrosterone Under Various Physiological Conditions. J Clin Endocrinol Metab. 1973; 37(1):140-4.
2. Hill M, et al. Age Relationships and Sex Differences in Serum Levels of Pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone in Healthy Subjects; Clin Chem Lab Med. 1999; 37(4):439-47.
3. Robel P, et al. Biosynthesis and Assay of Neurosteroids in Rats and Mice. J Steroid Biochem Mol Biol. 1995; 53:355-60.
4. Weusten JJ, et al. Early Time Sequence in Pregnenolone Metabolism to Testosterone in Homogenates of Human and Rat Testis. Endocrinology. 1987; 120(5):1909-13.
5. Akwa Y, et al. Neurosteroids: Biosynthesis, Metabolism and Function of Pregnenolone and Dehydroepiandrosterone in the brain. J Steroid Biochem Mol Biol. 1991; 40(1-3):71-81.
6. McKenna TJ, Brown RD. Pregnenolone in Man: Plasma Levels in States of Normal and Abnormal Steroidogenesis. J Clin Endocrinol Metab. 1974; 38(3):480-5.
7. McKenna TJ, et al. Pregnenolone, 17-OH-Pregnenolone, and Testosterone in Plasma of Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab. 1976; 42(5):918-25.
8. McKenna TJ, et al. Plasma Pregnenolone in Patients with Adrenal Tumors, ACTH Excess, or Idiopathic Hirsutism. J Clin Endocrinol Metab. 1977; 44(2):231-6.
9. Wilson JD, Foster, DW, eds. Williams Textbook of Endocrinology 8th Edition. London: W.B. Saunders Company; 1992:495-7.
10. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. Gynecol Obstet Invest. 1995; 40(2):139-40.

Please use only the valid version of the instructions for Use provided with the kit

Symbols:

| | | | | | |
|---|------------------------------|---|------------------|---|-----------------------------------|
|  | Storage temperature |  | Manufacturer |  | Contains sufficient for <n> tests |
|  | Expiry date | LOT | Batch code | IVD | For in-vitro diagnostic use only! |
|  | Consult instructions for use | CONT | Content | CE | CE labelled |
|  | Caution | REF | Catalogue number | | |

VERWENDUNGSZWECK

Für die direkte quantitative Bestimmung von Pregnenolon in Humanserum durch Enzymimmunoassay. Nur zu *in-vitro*-Diagnosezwecken.

TESTPRINZIP

Das Prinzip des folgenden Enzymimmunoassays folgt dem typischen kompetitiven Bindungsszenario. Competition um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen auf der Mikrotiterplatte entsteht zwischen einem unmarkierten Antigen (in Standards, Kontrollen und Patientenproben vorhanden) und einem enzymmarkierten Antigen (Konjugat). Die Wasch- und Abgießschritte entfernen ungebundenes Material. Nach dem Waschschrift wird das Enzymsubstrat zugegeben. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet. Die Extinktion wird mit einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration von Pregnenolon in der Probe. Eine Reihe von Standards wird verwendet, um eine Standardkurve zu erzeugen, von der die Mengen von Pregnenolon in den Patientenproben und Kontrollen direkt abgelesen werden können.

KLINISCHE ANWENDUNGEN

Pregnenolon (3β -hydroxypregn-5-en-20-on) ist das erste Steroid, das auf dem Steroidsyntheseweg aus Cholesterin gebildet wird, und es ist die gemeinsame Vorstufe für alle Nebennieren- und Gonadensteroid. Seine Bildung erfolgt in den Mitochondrien durch Spaltung der C20-Seitenkette von Cholesterin durch das P450SCC-Enzym. Einmal hergestellt, kann Pregnenolon für zwei Wege der Steroidsynthese verwendet werden. Pregnenolon kann entweder durch die enzymatische Wirkung von 17α -Hydroxylase in 17 -OH-Pregnenolon oder durch die von 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in Progesteron umgewandelt werden.

Erhöhte Pregnenolonspiegel treten bei Formen der kongenitalen adrenalen Hyperplasie (CAH) auf, bedingt durch 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Mangel oder 17α -Hydroxylase-Mangel. Höhere Werte wurden auch bei Frauen mit idiopathischem Hirsutismus gemeldet. Studien über Pregnenolonspiegel in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter zeigen, dass die höchsten Spiegel bei Frauen und Männern im Alter von ca. 17 bzw. 16 Jahren und die niedrigsten im Alter von etwa 37 bzw. 38 auftreten. Im Allgemeinen wurden bei Frauen im Vergleich zu Männern etwas höhere Werte gefunden.

Viele Bereiche der Pregnenolon-Physiologie sind noch zu erforschen. Die aktuelle Forschung zeigt, dass die Bestimmung von Pregnenolon in Serum für die Untersuchung seines Metaboliten Pregnenolonsulfat nützlich sein kann, von dem berichtet wurde, dass es verschiedene Wirkungen im Gehirn von Säugetieren und Zentralnervensystem ausübt.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Anwender sollten für den erfolgreichen Einsatz dieses Kits das Protokoll gründlich verstanden haben. Zuverlässige Leistung wird nur durch strenge und sorgfältige Einhaltung der Anleitung erreicht.
2. Es wird empfohlen eigene Kontrollmaterialien oder Serum-pools mit hoher und niedriger Konzentration in jeden Lauf zur Beurteilung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse einzubeziehen.
3. Wenn Wasser zur Verdünnung oder Rekonstitution zu verwenden ist, ist demineralisiertes oder destilliertes Wasser einzusetzen.
4. Um Kontakt mit potenziell schädlichen Substanzen zu reduzieren, sollten bei der Handhabung der Testreagenzien und Humanproben Handschuhe getragen werden.
5. Alle Reagenzien und Proben sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich durchgemischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben.
6. Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
7. Die Kontrollen, die im Kit enthalten sind, sollten in jeden Lauf eingeschlossen werden und innerhalb etablierter Vertrauensgrenzen liegen.
8. Unsachgemäße Verfahrenstechniken, unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen und unsachgemäße Lagerung der Reagenzien können in Frage kommen, wenn die Messwerte für die Kontrollen nicht in den etablierten Bereichen liegen.
9. Beim Lesen der Mikrotiterplatte beeinflussen Blasen in den Wells die Extinktionswerte (ODs). Entfernen Sie vor dem Messschritt jegliche Blasen sorgfältig.
10. Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte bei richtiger Lagerung farblos bleiben. Instabilität und Verunreinigung können an der Entstehung einer blauen Farbe erkannt werden, in welchem Fall die Lösung nicht verwendet werden sollte.
11. Beim Dosieren von Substrat und Stopplösung verwenden Sie keine Pipetten, in denen diese Flüssigkeiten in Kontakt mit Metallteilen kommen.
12. Um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, verwenden Sie zur Entnahme aller Reagenzien, Proben, Standards und Kontrollen jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze.
13. Verschiedene Chargen von Kit-Komponenten sind innerhalb eines Tests nicht zu mischen, und keine Komponente darf nach dem Verfallsdatum auf dem Etikett verwendet werden.
14. Kit-Reagenzien müssen gemäß nationalen Vorschriften als gefährlicher Abfall entsorgt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Alle Reagenzien in dem Kit sind für die direkte Bestimmung von Pregnenolon in menschlichem Serum geeicht. Das Kit ist nicht für die Bestimmung von Pregnenolon in Speichel, Plasma oder anderen Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs geeicht.
2. Verwenden Sie keine stark hämolysierten, lipämischen, ikterischen oder unsachgemäß gelagerten Sera.
3. Thimerosal enthaltende Proben oder Kontrollseren sind mit diesem Kit nicht kompatibel, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
4. Nur Standardlösung A darf verwendet werden, um Proben mit hoher Serumkonzentration zu verdünnen. Verwendung anderer Reagenzien kann zu falschen Ergebnissen führen.
5. Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für die klinische Diagnostik verwendet werden. Zum Beispiel hat das Auftreten heterophiler Antikörper bei Patienten, die regelmäßig Kontakt mit Tieren oder Tierprodukten haben, ein Störpotential für immunologische Tests. Daher sollte die klinische Diagnose alle Aspekte des Hintergrunds eines Patienten einschließlich der Häufigkeit seiner Exposition gegenüber Tieren/Tierprodukten berücksichtigen, wenn falsche Ergebnisse vermutet werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL

Humanserum, das zur Herstellung der Standards und Kontrollen verwendet werden kann, wurde auf das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen sowie auf Antikörper gegen HCV und HIV getestet und für nichtreaktiv befunden. Jedoch kann keine Testmethode mit absoluter Sicherheit Freiheit von HIV, HCV und Hepatitis-B-Virus oder anderen infektiösen Erregern garantieren. Die Reagenzien sollten als potentielle Biogefährdungen betrachtet und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie jede Blutprobe gehandhabt werden.

CHEMISCHE GEFAHREN

Kontakt mit Reagenzien, die TMB, Wasserstoffperoxid oder Schwefelsäure enthalten, vermeiden. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien: mit viel Wasser abwaschen. TMB steht im Verdacht, krebserregend zu sein.

PROBENNAHME UND -LAGERUNG

Etwa 0,2 ml Serum ist pro Doppelbestimmung erforderlich. Nehmen Sie 4–5 ml Blut in ein entsprechend gekennzeichnetes Röhrchen auf und lassen es gerinnen. Zentrifugieren Sie und entfernen vorsichtig die Serumschicht. Lagerung bei 4 °C bis zu 24 Stunden oder bei -10 °C oder kälter, wenn die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden sollen. Betrachten Sie alle Humanproben als potentielle Biogefährdungen und ergreifen geeignete Schutzmaßnahmen beim Umgang.

PROBENVORBEHANDLUNG

Dieses Assay ist ein Direktsystem; keine Probenvorbehandlung ist notwendig.

BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE

1. Präzisionspipetten für 50, 100, 150 und 300 µl
2. Einweg-Pipettenspitzen
3. Destilliertes oder demineralisiertes Wasser
4. Plattenschüttler
5. Mikrotiterplattenlesegerät mit einem 450-nm-Filtersatz und einer oberen OD-Messgrenze von 3.0 oder höher * (siehe Assayverfahren Schritt 10).

MITGELIEFERTE REAGENZIEN

1. AA E-0030

WASH-CONC 10x **Waschpufferkonzentrat - X10**

Inhalt: Eine Flasche Puffer mit nichtionischem Detergens und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 50 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:10 in destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 50 ml Waschpufferkonzentrat mit 450 ml Wasser verdünnen.

2. AA E-0055 **SUBSTRATE** **TMB Substrat** – Gebrauchsfertig
 Inhalt: Eine Flasche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem DMF- und DMSO-freien Puffer.
 Volumen: 16 ml/Flasche
 Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

3. AA E-0080 **STOP-SOLN** **Stopplösung** – Gebrauchsfertig
 Inhalt: Ein Fläschchen 1M Schwefelsäure.
 Volumen: 6 ml/Flasche
 Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
 H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

4. Standards und Kontrollen – Gebrauchsfertig

Nachfolgend sind ungefähre Konzentrationen angegeben; die genauen Konzentrationen finden sich auf den Etiketten der Fläschchen:

| Kat.-Nr. | Zeichen | Standard | Konzentration | Volumen/ Fläschchen |
|-----------|------------|-------------|---|------------------------|
| FR E-2701 | STANDARD A | Standard A | 0 ng/ml | 2,0 ml |
| FR E-2702 | STANDARD B | Standard B | 0,1 ng/ml | 0,5 ml |
| FR E-2703 | STANDARD C | Standard C | 0,4 ng/ml | 0,5 ml |
| FR E-2704 | STANDARD D | Standard D | 1,6 ng/ml | 0,5 ml |
| FR E-2705 | STANDARD E | Standard E | 6,4 ng/ml | 0,5 ml |
| FR E-2706 | STANDARD F | Standard F | 25,6 ng/ml | 0,5 ml |
| FR E-2751 | CONTROL 1 | Kontrolle 1 | Siehe Fläschchenetiketten für Erwartungswert und akzeptablen Bereich! | 0,5 ml |
| FR E-2752 | CONTROL 2 | Kontrolle 2 | | 0,5 ml |

Inhalt: Pregnenolon in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel. Hergestellt durch Dotieren von Puffer mit einer definierten Menge Pregnenolon.

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate im ungeöffneten Fläschchen oder wie auf dem Etikett angegeben. Einmal geöffnet, sollten die Standards innerhalb von 14 Tagen verwendet oder aliquotiert und eingefroren gelagert werden. Mehrfache Einfrier- und Auftauzyklen sind zu vermeiden.

5. FR E-2713 **ASSAY-BUFF** **Assay-Puffer** – Gebrauchsfertig
 Inhalt: Ein Fläschchen mit proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
 Volumen: 15 ml/Flasche
 Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 oC
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

6. FR E-2731 **96** **Mikrotiterplatte mit Anti-Pregnenolon-Kaninchenantikörper beschichtet - herausbrechbare Wells** - Gebrauchsfertig
 Inhalt: Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (12×8), mit polyklonalem Antikörper beschichtet, in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.
 Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

7. FR E-2740


CONJUGATE-CONC 50x

Pregnenolon-Meerrettichperoxidase(HRP)-Konjugat-Konzentrat – X50

| | |
|---------------|--|
| Inhalt: | Pregnenolon-HRP-Konjugat in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel. |
| Volumen: | 300 µl/Fläschchen |
| Lagerung: | Gekühlt bei 2 - 8 oC |
| Stabilität: | 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett. |
| Vorbereitung: | Vor der Verwendung 1:50 mit Assay-Puffer verdünnen (z. B. 40 µl HRP mit 2 ml Assay-Puffer). Wenn die ganze Platte verwendet werden soll, 240 µl HRP mit 12 ml Assay-Puffer verdünnen. Was übrigbleibt, ist zu entsorgen. |

TESTVERFAHRENProbenvorbereitung: **keine.**

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Standards, Kontrollen und Proben sollten jeweils doppelt getestet werden. Sobald das Verfahren begonnen wurde, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.

| | |
|---|--|
| 1. | Stellen Sie Arbeitslösungen von Pregnenolon-HRP-Konjugat und Waschpuffer her. |
| 2. | Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen. Verschließen Sie den Beutel und legen alle nicht verwendeten Streifen wieder zurück in den Kühlschrank. |
| 3. | Pipettieren Sie 50 µl jeder Standard, Kontrolle und Probe jeweils zweifach in entsprechend markierte Wells. |
| 4. | Pipettieren Sie jeweils 100 µl der Konjugat-Arbeitslösung in jeden Well. (Wir empfehlen Verwendung einer Mehrkanalpipette.) |
| 5. | 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler (\approx 200 UPM) inkubieren. |
| 6. | Waschen Sie die Wells 3x mit je 300 µl vorbereitetem Waschpuffer und schlagen die Platte fest auf saugfähigem Papier aus, um sicherzustellen, dass sie trocken ist (<i>Verwendung eines Waschautomaten wird empfohlen</i>). |
| 7. | Pipettieren Sie jeweils 150 µl TMB-Substrat in die Wells. |
| 8. | Die Platte 10 - 15 Minuten lang auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur inkubieren. (oder bis Standard A dunkelblaue Farbe für gewünschte OD erreicht). |
| 9. | Zu den gleichen Zeitintervallen wie in Schritt 7 je 50 µl Stopplösung in jeden Well pipettieren. |
| 10. | Messen der Platte auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung. |
|  | Wenn die OD die obere Messgrenze überschreitet oder kein 450-nm-Filter verfügbar ist, kann ersatzweise ein 405- oder 415-nm-Filter eingesetzt werden. Die optischen Dichten sind damit niedriger, jedoch hat dies keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der Patienten-/Kontrollproben. |

BERECHNUNGEN

1. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standard-Duplikats.
2. Zeichnen Sie auf halblogarithmischem Papier eine Standardkurve mit mittlerer optischer Dichten als Y-Achse und Standardkonzentration als X-Achse. Wenn Immunoassay-Software verwendet wird, wird eine 4-Parameter-Kurve oder 5-Parameter Kurve empfohlen.
3. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes unbekanntes Duplikats.
4. Lesen Sie die unbekanntes Werte direkt von der Standardkurve ab.
5. Wenn eine Probe mit mehr als 25,6 ng/ml gemessen wird, verdünnen Sie sie mit Standardlösung A auf eine Verdünnung von nicht mehr als 1:8. Das erhaltene Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

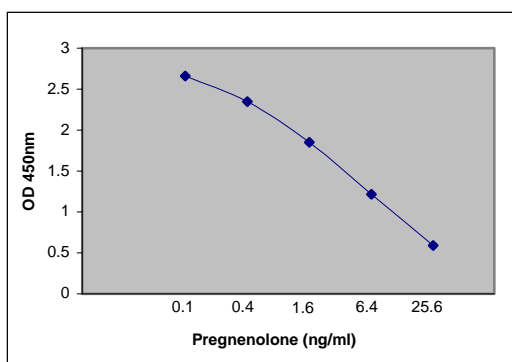
TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Beispielwerte. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.

| Standard | OD 1 | OD 2 | Mittelwert OD | Wert (ng/ml) |
|-----------|-------|-------|---------------|--------------|
| A | 2,891 | 2,808 | 2,850 | 0 |
| B | 2,613 | 2,651 | 2,632 | 0,1 |
| C | 2,350 | 2,343 | 2,347 | 0,4 |
| D | 1,823 | 1,879 | 1,851 | 1,6 |
| E | 1,237 | 1,197 | 1,217 | 6,4 |
| F | 0,589 | 0,594 | 0,591 | 25,6 |
| Unbekannt | 1,431 | 1,451 | 1,441 | 4,0 |

TYPISCHE STANDARDKURVE

Beispielkurve. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.



LEISTUNGSMERKMALE

EMPFINDLICHKEIT

Die untere Nachweisgrenze ergibt sich aus der Standardkurve durch die Bestimmung der resultierenden Konzentration der mittleren OD des Standards A (basierend auf 10 Analysen) minus 2σ. Daher beträgt die Empfindlichkeit des Pregnenolone ELISA Kit **0,05 ng/ml**.

SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Die folgenden Verbindungen wurden mit dem Pregnenolone ELISA Kit auf Kreuzreaktivität getestet, wobei 100% die Kreuzreaktivität von Pregnenolon war.

| Steroid | % Kreuzreaktivität |
|-----------------------|--------------------|
| Pregnenolon | 100 |
| Progesteron | 6,0 |
| Dehydroisoandrosteron | 5,2 |
| 5α-Androstandiol | 4,7 |
| Epiandrosteron | 1,0 |
| Pregnenolonsulfat | 0,4 |
| Androstandion | 0,3 |
| 5α-Androsteron | 0,3 |
| DHEAS | 0,2 |
| Etiocholanolon | 0,1 |

Die folgenden Steroide wurden getestet, aber zeigten weniger als 0,1% Kreuzreaktivität: Adrenosteron, Aldosteron, Androstendion, Cholesterin, Corticosteron, 5α-DHT, 17β-Östradiol, Östriol und Testosteron.

REPRODUZIERBARKEIT INNERHALB EINES ASSAYS

Drei Proben wurden jeweils 10-mal mit der gleichen Standardkurve getestet. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

| Probe | Mittelwert | StAbw | VK % |
|-------|------------|-------|------|
| 1 | 0,19 | 0,02 | 10,6 |
| 2 | 1,04 | 0,85 | 8,2 |
| 3 | 4,77 | 0,37 | 7,8 |

REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN ASSAYS

Drei Proben wurden zehn Mal über einen Zeitraum von vier Wochen untersucht. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

| Probe | Mittelwert | StAbw | VK % |
|-------|------------|-------|------|
| 1 | 0,22 | 0,03 | 14,5 |
| 2 | 1,14 | 0,14 | 12,3 |
| 3 | 4,56 | 0,44 | 9,6 |

WIEDERFINDUNG

Dotierte Proben wurden durch Zugabe von definierten Mengen von Pregnenolon zu vier Patientenserumproben hergestellt. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

| Probe | Beob. Resultat | Erw. Resultat | Wiederfindung (%) |
|-----------------------|----------------|---------------|-------------------|
| 1 Undotiert + 4,14 | 0,37 5,31 | - 4,51 | - 117,7 |
| 2 Undotiert + 4,01 | 0,77 5,69 | - 4,78 | - 119,0 |
| 3 Undotiert + 3,98 | 0,85 5,18 | - 4,83 | - 107,2 |
| 4 Undotiert + 3,78 | 1,47 6,31 | - 5,25 | - 120,2 |

LINEARITÄT

Drei Patientenserumproben wurden mit Standard A verdünnt. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind nachfolgend tabellarisch dargestellt:

| Probe | Beob. Resultat | Erw. Resultat | Wiederfindung (%) |
|-------|----------------|---------------|-------------------|
| 1 | 5,31 | - | - |
| 1:2 | 2,89 | 2,66 | 108,6 |
| 1:4 | 1,26 | 1,33 | 94,7 |
| 1:8 | 0,71 | 0,66 | 107,6 |
| 2 | 6,51 | - | - |
| 1:2 | 2,75 | 3,26 | 84,4 |
| 1:4 | 1,54 | 1,63 | 94,5 |
| 1:8 | 0,80 | 0,81 | 98,8 |
| 3 | 8,34 | - | - |
| 1:2 | 3,78 | 4,17 | 90,6 |
| 1:4 | 2,15 | 2,09 | 102,9 |
| 1:8 | 1,05 | 1,04 | 101,0 |

ERWARTETE STANDARDWERTE

Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und seinen eigenen Bereich erwarteter Standardwerte erstellen.












| Gruppe | N | MW (ng/ml) | Abs. Bereich (ng/ml) |
|--------|----|------------|----------------------|
| Männer | 30 | 0,50 | 0,1 - 3,4 |
| Frauen | 50 | 0,55 | 0,1 - 3,8 |

LITERATUR

1. Abraham GE, et al. Radioimmunoassay of Plasma Pregnenolone, 17-hydroxy-pregnenolone and Dehydroepiandrosterone Under Various Physiological Conditions. J Clin Endocrinol Metab. 1973; 37(1):140-4.
2. Hill M, et al. Age Relationships and Sex Differences in Serum Levels of Pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone in Healthy Subjects; Clin Chem Lab Med. 1999; 37(4):439-47.
3. Robel P, et al. Biosynthesis and Assay of Neurosteroids in Rats and Mice. J Steroid Biochem Mol Biol. 1995; 53:355-60.
4. Weusten JJ, et al. Early Time Sequence in Pregnenolone Metabolism to Testosterone in Homogenates of Human and Rat Testis. Endocrinology. 1987; 120(5):1909-13.
5. Akwa Y, et al. Neurosteroids: Biosynthesis, Metabolism and Function of Pregnenolone and Dehydroepiandrosterone in the brain. J Steroid Biochem Mol Biol. 1991; 40(1-3):71-81.
6. McKenna TJ, Brown RD. Pregnenolone in Man: Plasma Levels in States of Normal and Abnormal Steroidogenesis. J Clin Endocrinol Metab. 1974; 38(3):480-5.
7. McKenna TJ, et al. Pregnenolone, 17-OH-Pregnenolone, and Testosterone in Plasma of Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab. 1976; 42(5):918-25.
8. McKenna TJ, et al. Plasma Pregnenolone in Patients with Adrenal Tumors, ACTH Excess, or Idiopathic Hirsutism. J Clin Endocrinol Metab. 1977; 44(2):231-6.
9. Wilson JD, Foster, DW, eds. Williams Textbook of Endocrinology 8th Edition. London: W.B. Saunders Company; 1992:495-7.
10. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. Gynecol Obstet Invest. 1995; 40(2):139-40.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.

Symbole:

| | | | | | |
|---|------------------------------------|---|----------------|---|------------------------------------|
|  | Lagertemperatur |  | Hersteller |  | Enthält Testmaterial für <n> Teste |
|  | Verwendbar bis |  | Chargennummer |  | In vitro Diagnostikum |
|  | Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen |  | Inhalt |  | CE gekennzeichnet |
|  | Achtung |  | Katalog-Nummer | | |