

# Pregnenolone Direct ELISA (EIA-4170)

## Предназначение.

Для прямого количественного определения прегненолона методом ИФА в сыворотке. Только для диагностического использования ин-витро.

## Принцип анализа.

Принцип работы теста основывается на типичном конкурентном связывании.

Немеченый антиген (присутствующий в стандартах, контролях и образцах пациентов) и антиген с ферментной меткой (конъюгат) конкурируют за ограниченное число связей антител на микротитровальной лунке. При промывке несвязанный материал удаляется. Количество прегненолона с ферментной меткой, связанного с антителом обратно пропорционально концентрации неконъюгированного прегненолона. Набор стандартов используется для построения стандартной кривой, по которой определяется количество прегненолона в образцах пациента и контролях.

## Предупреждения и меры предосторожности.

1. Для успешного использования данного набора необходимо полное понимание данной инструкции. Надежный результат может быть достигнут только при строгом соблюдении настоящих инструкций.
2. Перед постановкой анализа все реагенты набора и образцы необходимо доводить до комнатной температуры и осторожно, но тщательно смешивать. Избегать повторного замораживания и оттаивания реагентов и образцов.
3. Для каждой постановки должна строиться собственная калибровочная кривая.

Контрольный материал или пулы сывороток **Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.**

3. Для разведения и или восстановления растворов использовать только деионизированную или дистиллированную воду.
4. Контроль должен быть включен в каждую постановку и значения результатов его исследования должны находиться в пределах установленных норм.
5. Завышенные или заниженные значения тестируемого контроля могут указывать на ненадлежащую технику проведения процедуры анализа, неточное пипетирование, некачественную промывку, неправильное хранение реагентов.
6. При считывании оптических плотностей на результате может сказаться присутствие пузырьков в лунках. Осторожно удалите пузырьки перед считыванием.
7. Субстрат-раствор ТМВ чувствителен к свету и при надлежащем хранении должен оставаться бесцветным. В случае нестабильности или контаминации появляется голубое окрашивание – при этом использовать субстрат в постановках нельзя.
8. При раскапывании субстрата и стоп-раствора нельзя использовать пипетки с металлическими частями.
9. Чтобы предотвратить контаминацию реагентов для добавления каждого реагента (образца, стандарта, контроля) необходимо использовать новый одноразовый наконечник.
10. Недопустимо использовать в одной постановке компоненты наборов разных лотов, а также реагенты с истекшим сроком годности (срок годности указан на этикетке).

## Ограничения.

1. Все реагенты набора калиброваны для прямого определения прегненолона в сыворотке. Набор не калиброван для определения прегненолона в слюне, плазме или других образцах человеческого или животного происхождения.
2. Не использовать сильно гемолизированные, жирные, желтушные образцы сыворотки или образцы, которые хранились неправильно.
3. Образцы или контрольные сыворотки, содержащие Азид или тиомерсал не совместимы с данным набором, т.к. их использование может привести к неверным результатам.
4. Для разведения высококонцентрированных образцов можно использовать только калибратор А. Использование другого реагента может привести к ложным результатам.
5. Результат, полученный на этом наборе, ни в коем случае не следует использовать как единственную основу для клинического диагноза.

## Сведения о безопасности реагентов набора:

Человеческие сыворотки, которые могут использоваться для приготовления стандартов и контролей, были протестированы и показали отрицательную реакцию на HBsAg, при тестировании на присутствие антител к HCV и HIV также дали отрицательный результат. Однако, не существует метода анализа, который гарантировал бы полное отсутствие вирусов HIV, HCV и Hepatitis B. С реагентами набора следует обращаться как с потенциально биологически опасными.

## Химическая безопасность:

Избегать контакта с реагентами, содержащими ТМБ, перекись водорода или серную кислоту. При контакте с кожей промыть большим количеством воды. ТМБ является потенциальным канцерогеном.

## Забор и подготовка образцов.

Для одного дубля требуется приблизительно 0.2 мл сыворотки. Отобрать 4-5 мл крови в промаркированную пробирку и дать свернуться. Центрифугировать и осторожно удалить слой сыворотки. Хранить при 4оС до 24 часов или при -10оС и ниже, если анализ будет проводиться в другой день.

## Необходимые реагенты и оборудование, не входящие в набор:

1. прецизионные пипетки на 50, 100, 150 и 300 мкл
2. одноразовые наконечники для пипеток
3. дистиллированная или деионизированная вода.
4. шейкер для микропланшет
5. микропланшетный ридер с фильтром на 450нм и верхней границей ОП 3.0 или более\* (см. этап 10 процедуры анализа).

## Реагенты набора:

1. Разделяемая микропланшета с нанесенными на лунки кроличьими антителами к прегненолону – готова к использованию .

## Pregnenolone Direct ELISA (EIA-4170)

Содержит: одна разделяемая микропланшета (96 лунок) с нанесенным на лунки кроличьим поликлональным антителом к прегненолону в пакете с замком, с влагопоглотителем.

Хранить: при температуре 2-8°C.

Стабильность: 12 месяцев или согласно указаниям на этикетке.

### 2. Концентрат 3 $\alpha$ диола Г конъюгированного с пероксидазой хрена – требует приготовления.

Содержит: конъюгат прегненолона с пероксидазой хрена в белковом буфере с безртутным консервантом.

Объем: 300 мкл/флакон

Хранение: при температуре 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или согласно указаниям на этикетке.

Приготовление: развести с буфером в соотношении 1:50 (напр. 40 мкл конъюгата в 2 мл буфера). Если будет использоваться вся планшета, развести 240 мкл пероксидазы хрена в 12 мл буфера. Остатки уничтожить.

### 3. Калибраторы 3 $\alpha$ диола Г – готовы к использованию.

Содержит: шесть флаконов с прегненолоном в протеиновом буфере с безртутным консервантом. Приготовлен добавлением в буфер определенного количества прегненолоном.

| Калибратор   | Концентрация | Объем/флакон |
|--------------|--------------|--------------|
| Калибратор А | 0 пг/мл      | 2.0 мл       |
| Калибратор В | 0.1 нг/мл    | 0.5 мл       |
| Калибратор С | 0.4 нг/мл    | 0.5 мл       |
| Калибратор D | 1.6 нг/мл    | 0.5 мл       |
| Калибратор E | 6.4 нг/мл    | 0.5 мл       |
| Калибратор F | 25.6 нг/мл   | 0.5 мл       |

Хранение: при 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев в невскрытых виалах или согласно указаниям на этикетке. После вскрытия стандарты необходимо использовать в течение 14 дней или поделить на аликвоты и заморозить. Не замораживать повторно.

### 4. Контроль - готов к использованию

Содержит: один виал содержит прегненолон в белковом буфере с безртутным консервантом. Приготовлен добавлением в буфер определенного количества прегненолона. Ожидаемые значения и приемлимый диапазон указаны на этикетке.

Объем: 0.5 мл/флакон

Хранение: при 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев в невскрытом виале или согласно указаниям на этикетке. После вскрытия контроль должен быть использован в течение 14 дней или поделен на аликвоты и заморожен. Избегать повторного замораживания.

### 5. Концентрат промывочного буфера – требует приготовления.

Содержит: один флакон с буфером неионным моющим средством и безртутным консервантом.

Объем: 50 мл/флакон

Хранение: при 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или согласно указаниям на этикетке.

Приготовление: развести 1:10 дистиллированной или деионизированной водой. Если будет использоваться вся плашка развести 50 мл концентрата промывочного буфера в 450 мл воды

### 6. Разбавитель – готов к использованию\* .

Содержит: один флакон протеинового буфера с безртутным консервантом.

Объем: 15 мл/фл.

Хранение: при 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев months or as indicated on label.

### 7. ТМБ субстрат - готов к использованию

7. ТМБ субстрат - готов к использованию.

Содержит: один флакон с тетраметилбензидином + перекись водорода в буфере не содержащем DMF или DMSO .

Объем: 16 мл/флакон

Хранение: при 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или согласно указаниям на этикетке.

### 8. Стоп-раствор – готов к использованию.

Содержит: 1 М серную кислоту

Объем: 6 мл/флакон

Хранение: при 2-8°C

Стабильность: 12 месяцев или согласно указаниям на этикетке.

### Процедура анализа.

Предварительная обработка образцов: не требуется.

Все реагенты должны достичь комнатной температуры перед использованием. Калибраторы, контроли и образцы следует ставить в дублях.

После начала процедуры все этапы должны выполняться без перерывов.

1. Приготовить рабочий раствор конъюгата прегненолона с пероксидазой хрена и промывочный раствор.

2. Удалить необходимое количество микротитровальных лунок. Плотно закрыть пакет и вернуть неиспользованные стрипы в холодильник.

3. Раскапать по 50 мкл каждого калибратора, контроля и образца пациента в промаркированные лунки в дублях.

4. Раскапать по 100 мкл рабочего раствора конъюгата в каждую лунку (мы рекомендуем использовать многоканальную пипетку).

5. Инкубировать в шейкере (прибл. 200 об/мин) 1 час при комнатной температуре.

6. Промыть лунки 3 раза по 300 мкл разведенного промывочного буфера на 1 лунку и резко вытряхнуть планшету на впитывающую бумагу.

7. Пипетировать 150 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку с определенными интервалами, используя многоканальную пипетку.

8. Инкубировать в шейкере 10-15 минут при комнатной температуре (или до момента когда калибратор А окрасится в темно-голубой цвет для требуемой ОП).

## Pregnenolone Direct ELISA (EIA-4170)

9. Раскапать по 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку с такими же интервалами как в п. 7.

10. Считать микропланшету на ридере при длине волны 450нм не позднее чем через 20 минут после добавления стоп-раствора.

\* Если ОП превышает верхнюю границу или фильтр 450нм отсутствует, можно использовать фильтр 405 или 415нм. ОП будут ниже, но это не повлияет на результат образца пациента / контроля.

### Расчеты:

1. Рассчитать среднюю оптическую плотность каждого дубля калибраторов.

2. Построить калибровочную кривую на полулогарифмической бумаге по значениям средних оптических плотностей, отложенным на оси Y, и значениям концентраций калибраторов, отложенным на оси X. При использовании программы обсчета рекомендуется 4 – параметровая кривая.

3. Рассчитать средние оптические плотности каждого дубля неизвестных.

4. Считать значения неизвестных прямо с калибровочной кривой.

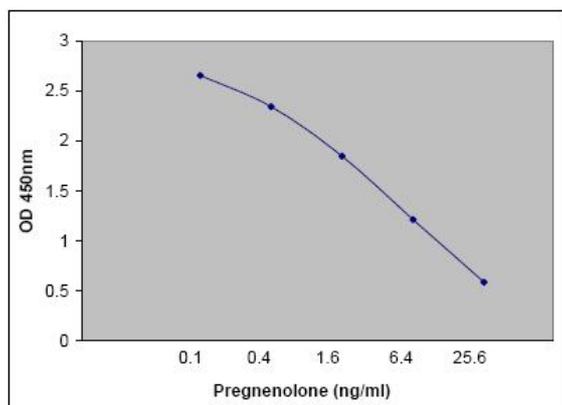
5. Если результат образца более 50 нг/мл, такой образец разводится калибратором А в соотношении не более 1 к 8. Полученный результат необходимо умножить на фактор разведения.

### Примерные данные:

| Calibrator  | 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          |
| Неизвестный | 1.431 | 1.451 | 1.441   | 4.0           |

### Примерная калибровочная кривая

Только в качестве примера. Не использовать для подсчета результатов.



### Чувствительность

Нижняя граница определения рассчитана по стандартной кривой. Была определена концентрация по средней ОП Калибратора А (по результатам серии из 10 тестов) за вычетом 2 SD. Таким образом, чувствительность набора ДРГ прегненолон ELISA составляет **0.05 нг/мл**.

### SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

Следующие соединения были проверены на перекрестную реакцию на наборе Direct Pregnenolone ELISA с кросс-реакцией прегненолона 100%.

| Стероид                   | % Кросс реакция |
|---------------------------|-----------------|
| Прегненолон               | 100             |
| Прогестерон               | 6.0             |
| Дигидроизоандростерон     | 5.2             |
| 5 $\alpha$ -андростандиол | 4.7             |
| Эпиандростерон            | 1.0             |
| Прегненолон сульфат       | 0.4             |
| Андростандион             | 0.3             |
| 5 $\alpha$ -андростерон   | 0.3             |
| ДГЭА-С                    | 0.2             |
| Этиохоланолон             | 0.1             |

Следующие стероиды были протестированы, но показали перекрестную реакцию менее 0.1%: адреностерон, альдостерон, андростендион, холестерин, кортикостерон, 5 $\alpha$ -ДГТ, 17 $\beta$ -эстрадиол, эстриол, тестостерон.

### Внутрисерийная точность

Три образца были исследованы 10кратно каждый с одной и той же калибровочной кривой.

Результаты (в нг/мл) приведены в таблице:

## Pregnenolone Direct ELISA (EIA-4170)

| Образец | Среднее SD | CV%  |
|---------|------------|------|
| 1       | 0.19       | 10.6 |
| 2       | 1.04       | 8.2  |
| 3       | 4.77       | 7.8  |

### Межсерийная точность

Три образца были исследованы 1-кратно в течение 4 недель. Результаты (в нг/мл) приведены ниже:

| Образец | Среднее SD | CV%  |
|---------|------------|------|
| 1       | 0.22       | 14.5 |
| 2       | 1.14       | 12.3 |
| 3       | 4.56       | 9.6  |

### Восстанавливаемость

Исследовались 4 образца пациентов с добавленными определенными количествами прегненолона. Результаты в нг/мл приведены ниже:

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

### Линейность

Сыворотки трех пациентов были разведены калибратором А. Результаты (в нг/мл) приведены ниже:

| 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     |

### Ожидаемые нормальные значения

| Group   | кол-во | Среднее (ng/ml) | Абс. диапазон(ng/ml) |
|---------|--------|-----------------|----------------------|
| Мужчины | 30     | 0.50            | 0.1-3.4              |
| Женщины | 50     | 0.55            | 0.1-3.8              |

### Справочная литература:

1. Abraham GE, et al. Radioimmunoassay of Plasma Pregnenolone. J Clin Endocrinol Metab 37(1): 40, 1973.
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 37(4): 439, 1999.
3. Robel P., et al. Biosynthesis and Assay of Neurosteroids in rats and mice. J Steroid Biochem Molec Biol. 53:335, 1995.
4. Weusten JJ, et al. Early time sequence in pregnenolone metabolism to testosterone in homogenates of human and rat testis. Endocrinology 120:1909, 1987.
5. Di Pietro DL, et al. A pregnenolone radioimmunoassay utilising a new fractionation technique of sheep antiserum. J Clin Endocrinol Metab 35:729, 1972.
6. Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.