

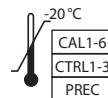
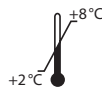
Pregnenolonsulfat LC-MS/MS Kit

*Zur Bestimmung von Pregnenolonsulfat
in Serum und Plasma*

*For the determination of pregnenolone sulfate
in serum and plasma*

Gültig ab / Valid from 2021-10-21

REF **KM2000**



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	4
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
<i>Lagerung</i>	5
<i>Vorbereitung der Kalibratoren und Kontrollen</i>	5
6. PROBENVORBEREITUNG	5
7. LC-MS/MS-METHODE	6
8. MUSTERCHROMATOGRAMME	6
<i>Blank</i>	7
<i>Kalibrator Pregnenolonsulfat (CAL1)</i>	8
<i>Interner Standard</i>	8
<i>Probe</i>	9
9. QUALITÄTSKONTROLLE	10
<i>Referenzbereich</i>	10
10. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Richtigkeit und Präzision</i>	10
<i>Sensitivität / Quantifizierungsgrenze (LLOQ)</i>	11
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
12. TECHNISCHE MERKMALE	11
13. ENTSORGUNG	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Pregnenolonsulfat LC-MS/MS Kit ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zur quantitativen Bestimmung von Pregnenolonsulfat in Serum und Plasma mittels LC-MS/MS nach vorheriger Fällungsreaktion. Der Kit ist für den manuellen und automatisierten Gebrauch durch professionelles Laborpersonal bestimmt. Als Ausgangsstoff für die Biosynthese von Neurosteroidhormonen, kann die Quantifizierung des Pregnenolonsulfates zur Überwachung dieser physiologischen Parameter beitragen.

2. EINLEITUNG

Steroide und Neurosteroide werden aus Cholesterol, der Grundform für diese Hormone, synthetisiert. Während die klassischen Steroide in Geweben wie der Nebenniere, den Gonaden oder der Plazenta produziert werden, entstehen Neurosteroide im Zentral- oder peripheren Nervensystem. Baulieu et al. zeigten in den 1980er Jahren, dass Steroide wie Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon im Zentralnervensystem *de novo* synthetisiert werden und im Gehirn in höheren Konzentrationen vorliegen als im Plasma. Im Allgemeinen werden diese Steroide als Neurosteroide bezeichnet und sind unterschiedlich im Gehirn und in der Hypophyse verteilt.

Neurosteroide werden ausgehend von Cholesterol über Pregnenolon und Progesteron gebildet (siehe Abb.1). Pregnenolon und Progesteron sind damit nicht nur Vorläufermoleküle für die Synthese von Gluco- und Mineralocorticoiden in der Nebenniere und von Sexualhormonen in den Gonaden und der Plazenta, sondern auch für die Synthese von Neurosteroiden im Zentralnervensystem, d.h. Pregnenolon ist ein endogenes, natürlich produziertes Steroid, welches einen Vorläufer für viele körpereigene Hormone darstellt.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Neurosteroide mit Neurotransmitterrezeptoren interagieren, die Erregbarkeit des Gehirns beeinflussen und somit als potente allosterische Modulatoren der Neurotransmitterrezeptoren fungieren können: Das endogene Neurosteroid Allopregnanolon, ein positiver Modulator des γ -Aminobuttersäure-Typ-A-(GABA_A)-Rezeptorkomplexes, aktiviert die durch Stress reduzierte GABA_A-Rezeptor-Funktion und zeigt angstlösende and anti-stress Wirkungen. Negative Modulatoren wie Dehydroepiandrosteronsulfat und Pregnenolonsulfat hemmen dagegen den GABA_A-Rezeptor fast vollständig.

Bedingt durch ihre Lipophilie können die meisten freien Steroide die Blut-Hirn-Schranke leicht passieren. Eine Reihe von Steroiden existiert auch als Sulfat- sowie Fettsäureester in Konzentrationen, die die Werte der freien Steroide bei weitem überschreiten. Sie können im Gegensatz zu den freien Steroiden das Gehirn nicht über die Blut-Hirn-Schranke verlassen und stellen damit aktive Formen dar, die an

der Kontrolle zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt sind.

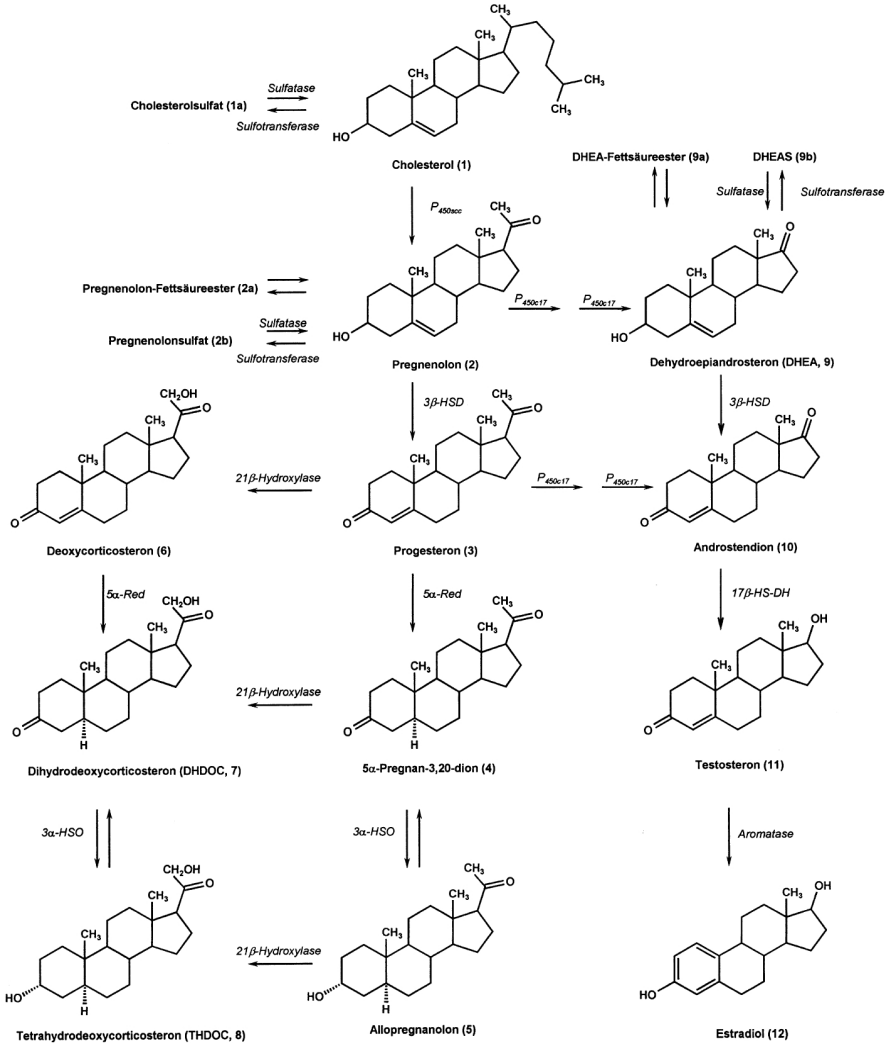


Abb. 1: Biosynthese neuroaktiver Steroide, Weiss M & Hess S, 2000

Neurosteroiden beeinflussen eine Reihe zentralnervöser Prozesse, welche Auswirkungen auf unser Denken und Empfinden haben. Darüber hinaus beeinflussen sie das Sozial- und Sexualverhalten. Gleichzeitig stellen sie eine vielversprechende

Arzneimittelgruppe für wichtige Indikationen wie Epilepsie, Angststörungen und Demenzen dar.

Aus diesen Gründen wird die Bestimmung der Neurosteroiden, insbesondere des Pregnenolons bzw. Pregnenolonsulfats, zum besseren Verständnis ihrer Rolle, zur Diagnose psychischer und mental-psychischer Störungen und zur Entwicklung neuer steroidischer Medikamente beitragen.

Indikationen

- Kognitive Leistungsfähigkeit
- Gedächtnisschwäche
- Stimmungsschwankungen wie Depressionen

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM0002	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 ml
KM2000	CAL1–6	Kalibratoren 1-6, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	1 Fläschchen (à 250 µl) pro Level
	CTRL1–3	Kontrollen 1-3, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	1 Fläschchen (à 250 µl) pro Level
	DILSOL	Verdünnungslösung (siehe Probenvorbereitung)	50 ml
	MOPHAA	Laufmittel A	500 ml
	MOPHAB	Laufmittel B	500 ml
	PREC	Fällungsreagenz (-20 °C, enthält den internen Standard)	25 ml

Bitte verwenden Sie für Nachbestellungen von Einzelkomponenten als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung ohne Leerzeichen.

Folgendes Zubehör kann für die Pregnenolonsulfat-LC-MS/MS-Applikation bei Immundiagnostik AG separat bestellt werden:

- Tuninglösung für Pregnenolonsulfat (KM2000TU)
- Tuninglösung für den internen Standard (KM2000TS)
- UPLC-Säule (KM2000SP)
- In-Line Filter (KM2000IF)
- In-Line Filterhalter (KM2000IH)

- 96-Deep-Well-Platte (KM2000DP)

Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße oder 96-Deep-Well-Platte mit Verschlussmöglichkeit
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Zentrifuge, 8 900 g für 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäße oder 150 g für Mikrotiterplatten
- Vortex- oder Mikrotiterplatten-Mixer
- LC-MS/MS-Anlage
- LC-MS Probenvials

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Lagerung

Die Testreagenzien sollten lichtgeschützt, trocken und bei ihrer angegebenen Lagertemperatur (CAL1–6, CTRL1–3, PREC: -20 °C; alle anderen Komponenten: 2–8 °C) gelagert werden. Die so gelagerten Testreagenzien sind bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

Hinweis: Nach Vorbereitung der Reagenzien für die Testdurchführung können andere Stabilitäten gelten (siehe jeweiliger Vorbereitungsschritt).

Vorbereitung der Kalibratoren und Kontrollen

Die Kalibratoren (CAL1–6) und die Kontrollen (CTRL1–3) werden in je 250 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL) bei 30 s vortexen gelöst.

Hinweis: Nach Rekonstitution mit der Rekonstitutionslösung (RECSOL) sind die Kalibratoren (CAL1–6) und die Kontrollen (CTRL1–3) bei 2–8 °C für 10 Tage stabil.

6. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignet sich Serum oder Plasma.

Bei der Verwendung von Citrat-Plasma muss für die spätere Auswertung der Verdünnungsfaktor in dem Blutentnahmeröhrchen mit der Citratlösung (i. d. R. Faktor 1:10) beachtet werden.

Im Test dürfen, bis auf das Fällungsreagenz (PREC), nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (15–30 °C) aufweisen.

Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.

Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

	96-Deep-Well-Platte	1,5 ml Reaktionsgefäß
1.	50 µl Probe, Kalibrator (CAL) oder Kontrolle (CTRL) in eine Kavität bzw. ein Reaktionsgefäß vorlegen.	
2.	250 µl eiskaltes (-20 °C) Fällungsreagenz (PREC) hinzugeben.	
3.	Platte verschließen und 5 min bei 1 000 rpm schütteln lassen.	Gefäß verschließen und 1 min vortexen.
4.	Zentrifugation bei 150g für 15 min.	Zentrifugation bei 8900g für 15 min.
5.	400 µl Verdünnungslösung (DILSOL) in neuer Kavität der 96-Deep-Well-Platte oder LC-MS Probenvial vorlegen.	
6.	100 µl des Probenüberstandes (aus Schritt 4.) in vorgelegte DILSOL überführen.	
7.	Mischen der Probe durch auf- und abpipettieren.	-
8.	Platte verschließen und weitere 5 min schütteln bei 1 000 rpm lassen.	LC-MS Probenvials verschließen und 5 s vortexen.
9.	Injektion in das LC-MS System (siehe <i>Application Note</i>).	

7. LC-MS/MS-METHODE

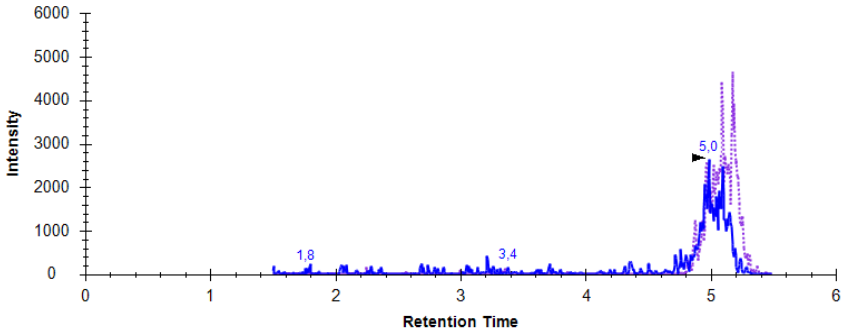
Bitte entnehmen Sie die Parameter zur Einstellung der LC-MS/MS-Methode dem *Application Note* oder wenden Sie sich an lcms@immundiagnostik.com.

8. MUSTERCHROMATOGRAMME

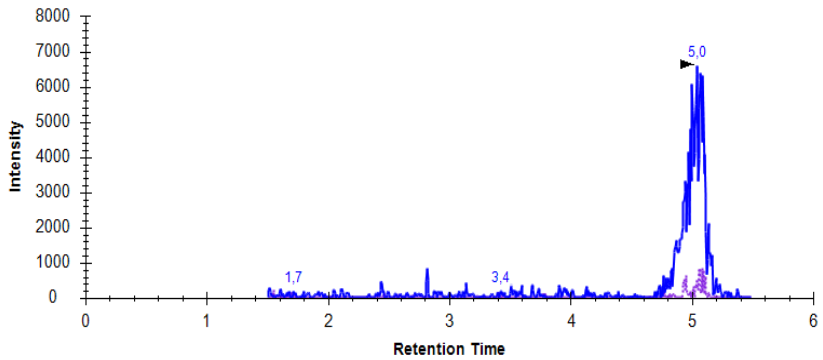
Es muss beachtet werden, dass die Retentionszeit und Signalintensität geräteabhängig variieren kann.

Blank

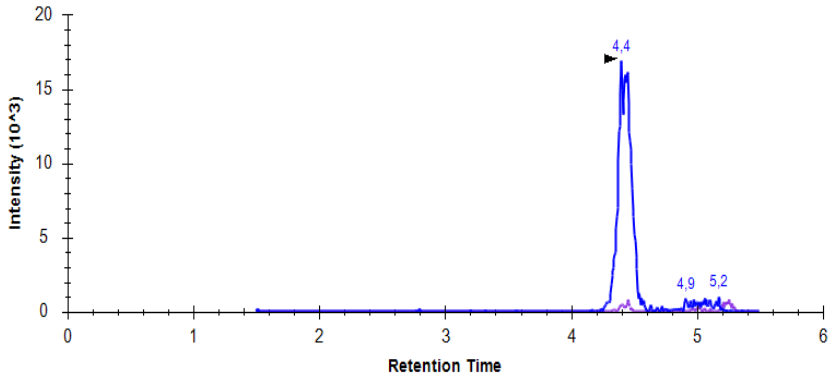
Pregnenolonsulfat



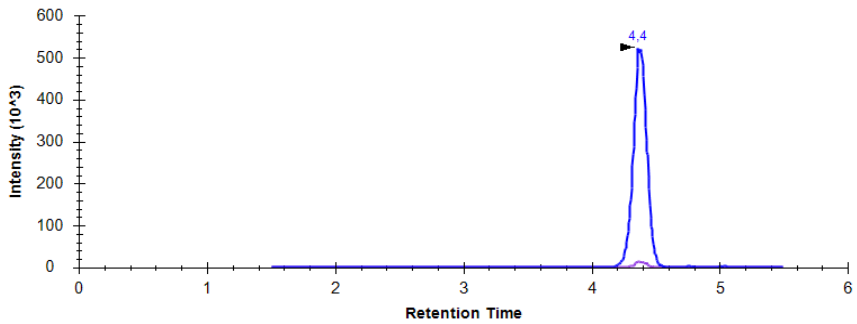
Interner Standard



Kalibrator Pregnenolonsulfat (CAL1)

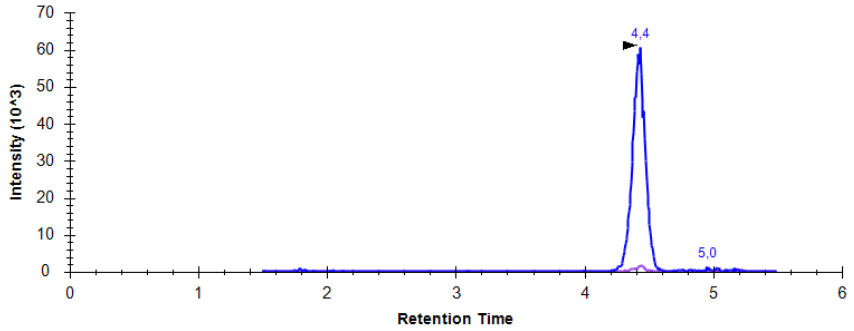


Interner Standard

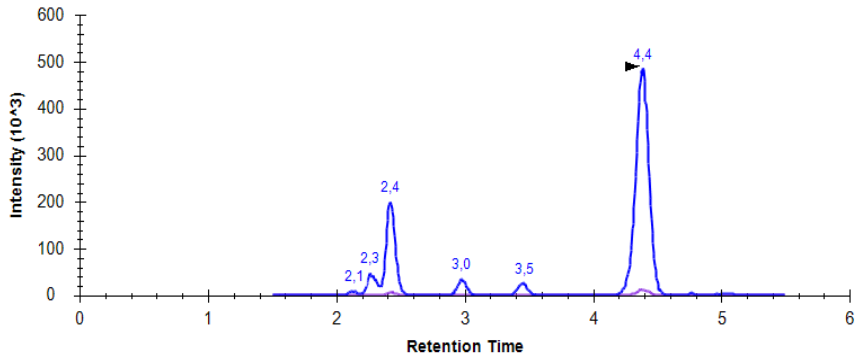


Probe

Pregnenolonsulfat



Interner Standard



9. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches (siehe Produktspezifikation), kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

Referenzbereich

20–155 ng/ml in Serum

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Richtigkeit und Präzision

96-Deep-Well-Platte

Probe [ng/ml]	Richtigkeit		Präzision	
	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=15)	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=15)
12,2	107,8%	103,7%	6,4%	5,7%
72,6	106,4%	103,4%	5,1%	3,8%
145,2	105,5%	100,3%	4,5%	5,1%

1,5 ml Reaktionsgefäß

Probe [ng/ml]	Richtigkeit		Präzision	
	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=15)	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=15)
12,2	98,8%	98,1%	3,3%	2,3%
72,6	102,2%	101,2%	4,5%	2,9%
145,2	101,6%	100,2%	2,1%	1,8%

Sensitivität / Quantifizierungsgrenze (LLOQ)

Der LLOQ bezeichnet die niedrigste Konzentration des Analyten, die sich noch quantifizieren lässt:

Pregnenolonsulfat: 11,5 ng/ml

Es muss beachtet werden, dass die Quantifizierungsgrenze nicht ausschließlich applikations-, sondern auch geräteabhängig ist.

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Es sind die auf den Einzelkomponenten angegebenen GHS-Symbole und Spezifikationen der Sicherheitsdatenblätter (auf Anfrage bei Immunodiagnostik AG erhältlich) zu beachten. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutzvorkehrungen einzuhalten.

12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Der Assay ist immer nach dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.

13. ENTSORGUNG

Laufmittel (MOPHAA, MOPHAB), Verdünnungslösung (DILSOL) und Fällungsreagenz (PREC) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Die Kalibratoren (CAL1-6) und Kontrollen (CTRL1-3) sollten aufgrund ihrer Behandlung als potentiell infektiöses Material gemäß den örtlichen Vorschriften entsorgt werden.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST












- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Sollten eine oder mehrere Komponenten des Testkits beschädigt, unvollständig (siehe Liste der Testbestandteile) oder Präzipitate in den gebrauchsfertigen Lösungen sichtbar sein, kontaktieren Sie bitte Immundiagnostik AG.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Hu, Z Y, Bourreau, E, Jung-Testas, I, Robel, P, Baulieu, E E: Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone, *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (1987), 8215-8219
2. Rupprecht, R, Holsboer, F: Neuroactive steroids: mechanism of action and neuropsychological perspectives, *Trends Neurosci* **22** (1999), 410-416
3. Mehta, A K, Ticku, M K: An update on GABAA receptors, *Brain Res Brain Res Rev* **29** (1999), 196-217
4. Lambert, J J, Belelli, D, Hill-Venning, C, Peters, J A: Neurosteroids and GABAA receptor function, *Trends Pharmacol Sci* **16** (1995), 295-303
5. Park-Chung, M, Malayev, A, Purdy, R H, Gibbs, T T, Farb, D H: Sulfated and unsulfated steroids modulate γ -aminobutyric acidA receptor function through distinct sites, *Brain Res* **830** (1999), 72-87

6. Monaghan, E P, Navalta, L A, Shum, L, Ashbrook, D W, Lee, D A: Initial human experience with ganaxolone, a neuroactive steroid with antiepileptic activity, *Epilepsia* **38** (1997), 1026-1031
7. Weiss M & Hess S: Neuroaktive Steroide: Wirkungen und Risiken, *Pharmazie in unserer Zeit* **29. Jahrg** (2000) 6: 372-376
8. Jäntti SE, Tammimäki A, Raattamaa H, Piepponen P, Kostianen R, Ketola RA: Determination of steroids and their intact glucuronide conjugates in mouse brain by capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* **82** (2010) Apr 15; (8):3168-75

Verwendete Symbole:

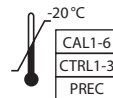
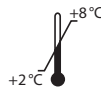
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

Pregnenolone sulfate LC-MS/MS kit

*For the determination of pregnenolone sulfate
in serum and plasma*

Valid from 2021-10-21

REF **KM2000**



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	19
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	20
<i>Storage</i>	20
<i>Preparation of the calibrators and controls</i>	20
6. SAMPLE PREPARATION	20
7. LC-MS/MS METHOD	21
8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	21
<i>Blank</i>	22
<i>Calibrator pregnenolone sulfate (CAL1)</i>	23
<i>Internal standard</i>	23
<i>Sample</i>	24
9. QUALITY CONTROL	25
<i>Reference range</i>	25
10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
<i>Accuracy and precision</i>	25
<i>Sensitivity / limit of quantification (LLOQ)</i>	26
11. PRECAUTIONS	26
12. TECHNICAL HINTS	26
13. DISPOSAL	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27
15. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

The pregnenolone sulfate LC-MS/MS kit is an *in vitro* diagnostic tool for the quantitative determination of pregnenolone sulfate by LC-MS/MS in serum and plasma after precipitation reaction. The kit is for manual and automatic use by professional laboratory staff. As a precursor for the biosynthesis of neurosteroid hormones, the quantification of pregnenolone sulfate can contribute to the monitoring of these physiological parameters.

2. INTRODUCTION

Steroids and neurosteroids are synthesized from cholesterol, the basic building block of all steroid hormones. While the classic steroids are produced in tissues like adrenal gland, gonads or placenta, the synthesis of neurosteroids takes place in the central and peripheral nervous system. In the 1980s, Baulieu et al. demonstrated that several steroids, such as dehydroepiandrosterone and pregnenolone, are synthesized *de novo* in the central nervous system and present in higher concentrations in the brain than in the blood. These steroids are universally referred as neurosteroids and are differently distributed in the brain and the pituitary gland.

Neurosteroids are formed from cholesterol via pregnenolone and progesterone (see Fig.1). Pregnenolone and progesterone are precursors not only of the synthesis of gluco- and mineral corticoids in the adrenal gland and of the sexual hormones in the gonads or placenta, but also of neurosteroids in the central nervous system, i.e. pregnenolone is an endogenous, naturally produced steroid that is a precursor of many body hormones.

Numerous studies have demonstrated that neurosteroids interact with neurotransmitter receptors, influence the brain excitability, thereby functioning as potent allosteric modulators of several neurotransmitter receptors: the endogenous neurosteroid allopregnanolone, a positive modulator of the γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor complex, activates the GABA_A receptor functions lowered by various stresses, and has anxiolytic and anti-stress effects. In contrast, negative modulators, like dehydroepiandrosterone sulfate and pregnenolone sulfate, inhibit almost completely the GABA_A-receptor.

Due to their lipophilicity, most of the free steroids can easily pass the blood-brain barrier. A number of steroids are conjugated as sulfate or fatty acid esters and occur in concentrations much higher than these of the free steroids. In contrast to the free steroids, they can not pass through the blood-brain barrier and represent the active forms involved in the control of various physiological and pathophysiological processes.

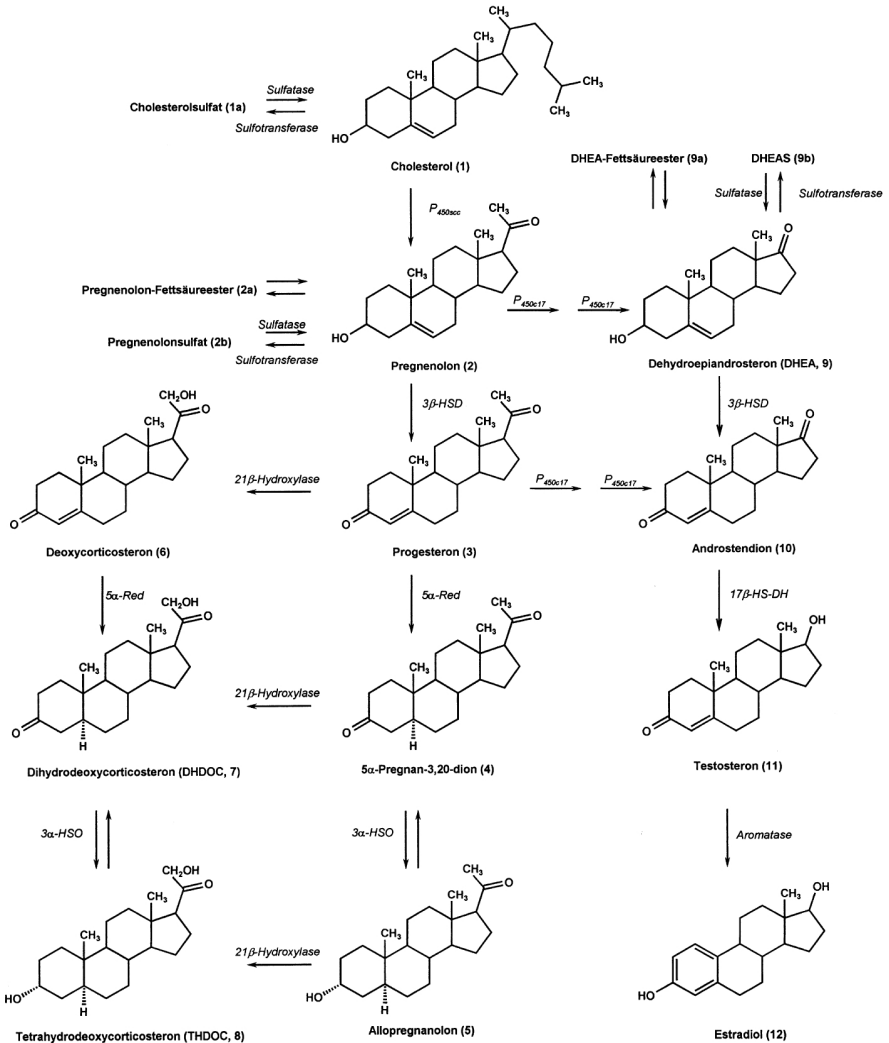


Fig.1: Biosynthesis of neuroactive steroids, Weiss M & Hess S, 2000

Neurosteroids affect a number of processes in the central nervous system, which have a powerful effect on our thinking and feeling. Furthermore, neurosteroids influence the social and sexual behavior. At the same time, they are promising pharmaceutical targets for important indications like epilepsy, anxiety disorders and dementia.

For these reasons, the determination of neurosteroids, especially of pregnenolone and pregnenilone sulfate, is expected to be helpful for understanding the roles of neurosteroids, for diagnosis of psychic or mental disorders and for the development of new steroidal therapeutic agents.

Indications

- Cognitive ability
- Weakness of memory
- Mood swings like depression

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM0002	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml
KM2000	CAL1–6	Calibrators 1-6, lyophilized (see product specification for concentration)	1 vial (à 250 µl) per level
	CTRL1–3	Control 1-3, lyophilized (see product specification for concentration)	1 vial (à 250 µl) per level
	DILSOL	Dilution solution (see sample preparation)	50 ml
	MOPHAA	Mobile phase A	500 ml
	MOPHAB	Mobile phase B	500 ml
	PREC	Precipitation reagent (-20°C, contains internal standard)	25 ml

For reorders of single components, please use the catalogue number followed by the label without space as product number.

The following accessories for the pregnenolone sulfate LC-MS/MS kit can be ordered separately at Immundiagnostik AG:

- tuning solution for pregnenolone sulfate (KM2000TU)
- tuning solution for the internal standard (KM2000TS)
- UPLC column (KM2000SP)
- in-line filter (KM2000IF)
- in-line filter holder (KM2000IH)
- 96-deep well plate (KM2000DP)

Please ask for our single component price list.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1.5 ml Eppendorf reaction tubes or 96-deep well plate with fastening option
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1 000 μl
- Centrifuge, 8 900 g for 1.5 ml Eppendorf reaction tubes or 150 g for microtiter plates
- Vortex or microtiter plate mixer
- LC-MS/MS equipment
- LC-MS vials

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

Storage

The test reagents should be stored protected from light, dry and their specified storage temperature (CAL1–6, CTRL1–3, PREC: -20°C ; all other components $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$). The test reagents stored in this way are usable until the indicated expiry date.

Note: After preparation of the test reagents for the test procedure other stabilities might apply (see respective preparation step).

Preparation of the calibrators and controls

The calibrators (CAL1–6) and the controls (CTRL1–3) are dissolved in 250 μl reconstitution solution (RECSOL) each while 30 s vortexing.

Note: After reconstitution with the reconstitution solution (RECSOL), the calibrators (CAL1–6) and the controls (CTRL1–3) are stable at $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ for 10 days.

6. SAMPLE PREPARATION

Serum and plasma samples are suited for the assay.

When using citrate plasma, the dilution factor in the blood collection tube with the citrate solution (usually a factor of 1:10) must be taken into account for the later evaluation.

With exception of the precipitation reagent (PREC), only reagents and samples at room temperature ($15\text{--}30^{\circ}\text{C}$) should be used in the test.

Before use, mix reagents and samples well.

Control samples should be analyzed with each run.

	96-deep well plate	1.5 ml reaction tube
1.	Add 50 µl sample, calibrator (CAL) or control (CTRL) in one well respectively reaction tube.	
2.	Add 250 µl ice-cold (-20 °C) precipitation reagent (PREC).	
3.	Seal plate and shake for 5 min at 1 000 rpm.	Seal tubes and vortex for 1 min.
4.	Centrifuge for 15 min at 150 g.	Centrifuge for 15 min at 8 900 g.
5.	Add 400 µl dilution solution (DILSOL) in a new well or LC-MS vial.	
6.	Transfer 100 µl of the supernatant (from step 4.) to the DILSOL presented.	
7.	Mix the sample by pipetting up and down.	-
8.	Seal plate and shake for 5 min at 1 000 rpm.	Seal LC-MS vials and vortex for 5 s.
9.	Injection into the LC-MS system (see application note).	

7. LC-MS/MS METHOD

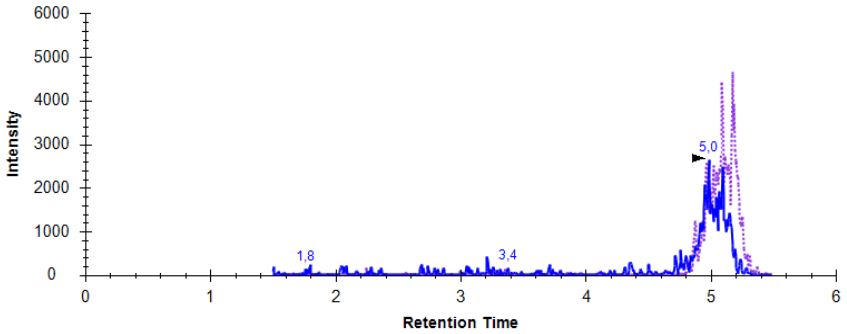
Please refer to the application note or contact lcms@immundiagnostik.com for the parameters for setting the LC-MS/MS method.

8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

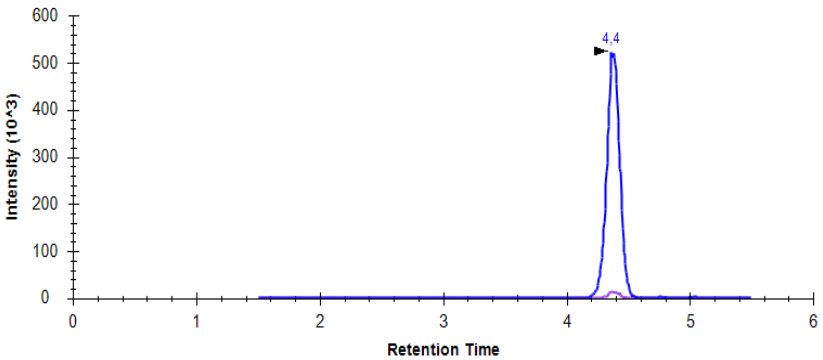
It must be noted that the retention time and signal intensity may vary depending on the device.

Blank

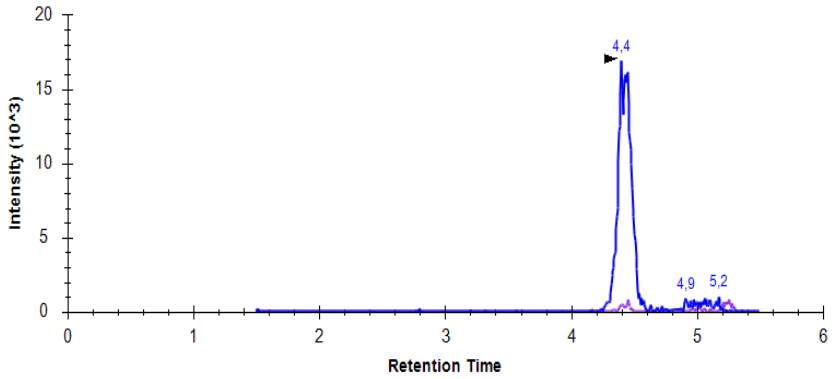
Pregnenolone sulfate



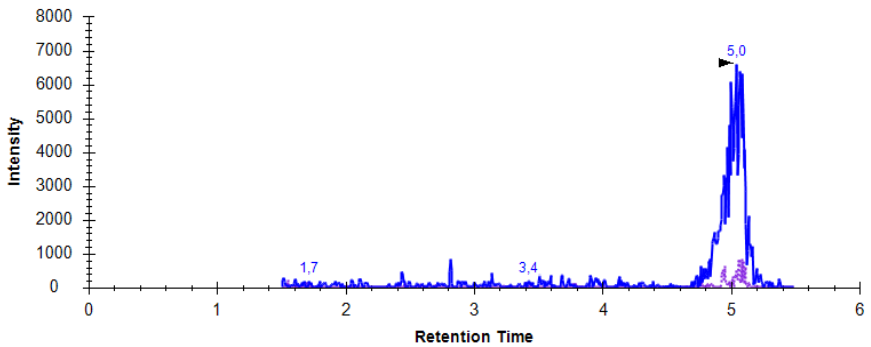
Internal standard



Calibrator pregnenolone sulfate (CAL1)

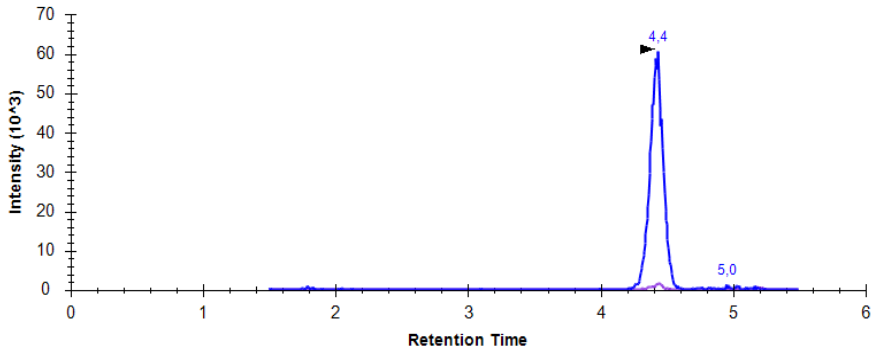


Internal standard

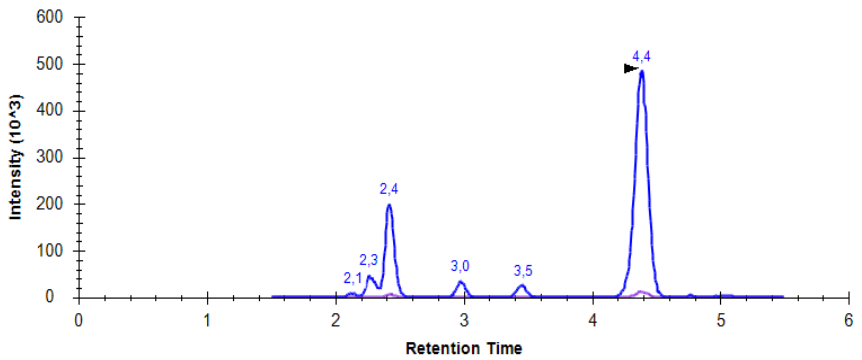


Sample

Pregnenolone sulfate



Internal standard



9. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits (see product specification).

Reference range

20–155 ng/ml

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy and precision

96-deep well plate

sample [ng/ml]	accuracy		precision	
	intra-day (n=5)	inter-day (n=15)	intra-day (n=5)	inter-day (n=15)
12.2	107.8%	103.7%	6.4%	5.7%
72.6	106.4%	103.4%	5.1%	3.8%
145.2	105.5%	100.3%	4.5%	5.1%

1.5 ml reaction tube

sample [ng/ml]	accuracy		precision	
	intra-day (n=5)	inter-day (n=15)	intra-day (n=5)	inter-day (n=15)
12.2	98.8%	98.1%	3.3%	2.3%
72.6	102.2%	101.2%	4.5%	2.9%
145.2	101.6%	100.2%	2.1%	1.8%

Sensitivity / limit of quantification (LLOQ)

The LLOQ designates the lowest concentration of the analyte that can still be quantified:

pregnenolone sulfate: 11.5 ng/ml

It is important to note that the quantification limit is not exclusively application-dependent, but also device-dependent.

11. PRECAUTIONS

- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- The GHS symbols indicated on the individual components and specifications of the material safety data sheets (available on request from Immunodiagnostik AG) must be noted. When working with these reagents, the legal protective precautions must be adhered to.

12. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.
- Plugs and caps of different reagents should not be swapped.

13. DISPOSAL

Mobile phases (MOPHAA, MOPHAB) dilution solution (DILSOL) and precipitation reagent (PREC) must be disposed as non-halogenated solvents. The calibrators (CAL1-6) and controls (CTRL1-3) should be disposed due to their treatment as potentially infectious material in accordance with local regulations.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE












- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Please contact Immundiagnostik AG if one or more components of the kit are damaged, missing (see material supplied) or precipitates are visible in the ready-to-use solutions.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Hu, Z Y, Bourreau, E, Jung-Testas, I, Robel, P, Baulieu, E E: Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone, *Proc Natl Acad Sci USA* **84** (1987), 8215-8219
2. Rupprecht, R, Holsboer, F: Neuroactive steroids: mechanism of action and neuropsychological perspectives, *Trends Neurosci* **22** (1999), 410-416
3. Mehta, A K, Ticku, M K: An update on GABAA receptors, *Brain Res Brain Res Rev* **29** (1999), 196-217
4. Lambert, J J, Belelli, D, Hill-Venning, C, Peters, J A: Neurosteroids and GABAA receptor function, *Trends Pharmacol Sci* **16** (1995), 295-303
5. Park-Chung, M, Malayev, A, Purdy, R H, Gibbs, T T, Farb, D H: Sulfated and unsulfated steroids modulate γ -aminobutyric acidA receptor function through distinct sites, *Brain Res* **830** (1999), 72-87
6. Monaghan, E P, Navalta, L A, Shum, L, Ashbrook, D W, Lee, D A: Initial human experience with ganaxolone, a neuroactive steroid with antiepileptic activity, *Epilepsia* **38** (1997), 1026-1031

7. Weiss M & Hess S: Neuroaktive Steroide: Wirkungen und Risiken, *Pharmazie in unserer Zeit* **29. Jahrg** (2000) 6: 372-376
8. Jääntti SE, Tammimäki A, Raattamaa H, Piepponen P, Kostianen R, Ketola RA: Determination of steroids and their intact glucuronide conjugates in mouse brain by capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* **82** (2010) Apr 15; (8):3168-75

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

