Instructions for Use

5α Dihydrotestosterone (DHT) ELISA

IVD

REF EIA-2330

Σ 96

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

(11.0 / June 28, 2023)

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.

ENGLISH 2

DEUTSCH 11

LITERATURE 20

SYMBOLS USED 21

1 INTENDED PURPOSE & USE

For the quantitative measurement of Dihydrotestosterone (DHT) in human serum by an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

This kit is intended for professional use only and is for laboratory use only.

For *in vitro* diagnostic use only.

Intended to be used manually but may be adaptable to open automated analyzers. The user is responsible for validating the performance of this kit with any automated analyzers.

2 LIMITATIONS RELATED TO INTENDED PURPOSE & USE

1. This test is not intended to be used for screening purposes.
2. This test is not intended for home testing or self-testing.
3. The kit is calibrated for the determination of DHT in human serum. The kit is not calibrated for the determination of DHT in other specimens of human or animal origin.
4. The results obtained with this kit shall never be used as the sole basis for a clinical diagnosis and for therapeutic decisions.
5. Although common interfering substances have been evaluated with this test, other substances that have not been evaluated such as drugs and the occurrence of heterophilic antibodies in individuals regularly exposed to animals or animal products have the potential of causing interferences.

3 SUPPLEMENTAL INFORMATION

Dihydrotestosterone (DHT) is the most active natural androgen in humans with a principal role in the development of primary and secondary sexual characteristics and potential participation in a myriad of other physiological processes. The bulk of androgen production takes place mainly in the Leydig cells of the testes. Androgens circulate in the blood bound to proteins, especially sex hormone binding globulin (SHBG) from peripheral conversion of testosterone, while in females most of the DHT is derived from androstenedione.

Some of the main clinical indications of the DHT measurement in serum are investigations of delayed puberty in men and evaluation of the presence of active testicular tissue[1].

4 PRINCIPLE OF THE TEST

The 5alpha-Dihydrotestosterone ELISA is a competitive immunoassay. Competition occurs between DHT present in calibrators, controls, specimen samples and an enzyme-labelled antigen (HRP conjugate) for a limited number of anti-DHT antibody binding sites on the microplate wells. After a washing step that removes unbound materials, the TMB substrate (enzyme substrate) is added which reacts with HRP to form a blue-coloured product that is inversely proportional to the amount of DHT present. Following an incubation, the enzymatic reaction is terminated by the addition of the stopping solution, converting the colour from blue to yellow. The absorbance is measured on a microplate reader at 450 nm. A set of calibrators is used to plot a calibrator curve from which the amount of DHT in specimen samples and controls can be directly read.

5 PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. This kit is for use by trained laboratory personnel (professional use only). For laboratory *in vitro* use only.
2. Practice good laboratory practices when handling kit reagents and specimens. This includes:
   - Do not pipette by mouth.
   - Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are handled.
   - Wear protective clothing and disposable gloves.
   - Wash hands thoroughly after performing the test.
   - Avoid contact with eyes; use safety glasses; in case of contact with eyes, flush eyes with water immediately and contact a doctor.
3. 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.
4. Do not use the kit beyond the expiry date stated on the label.
5. If the kit reagents are visibly damaged, do not use the test kit.
6. Do not use kit components from different kit lots within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
7. All kit reagents and specimens must be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of specimens.
8. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
9. Immediately after use, each individual component of the kit must be returned to the recommended storage temperature stated on the label.

10. A calibrator curve must be established for every run.
11. It is recommended to all customers to prepare their own control materials or serum pools which should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
12. The controls (included in kit) must be included in every run and their results must fall within the ranges stated in the quality control certificate; a failed control result might indicate improper procedural techniques or pipetting, incomplete washing, or improper reagent storage.
13. When dispensing the substrate and stopping solutions, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
14. The TMB Substrate 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.
15. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
16. Samples or controls containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, they may lead to false results.
17. Samples values above the measuring range of the kit may be reported as >2500 pg/mL. If further dilution and retesting is required, only serum samples with a known low DHT concentration (< 50 pg/mL) may be used to dilute serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
18. Avoid microbial contamination of reagents.
19. To prevent the contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator, and control.
20. To prevent the contamination of reagents, do not pour reagents back into the original containers.
21. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to local and/or national regulations.
22. Consumables used with the kit that are potentially biohazardous (e.g., pipette tips, bottles or containers containing human materials) must be handled according to biosafety practices to minimize the risk of infection and disposed of according to local and/or national regulations relating to biohazardous waste.
23. This kit contains 1 M sulfuric acid in the stopping solution component. Do not combine acid with waste material containing sodium azide or sodium hypochlorite.
24. The use of safety glasses, and disposable plastic, is strongly recommended when manipulating biohazardous or bio-contaminated solutions.
25. Proper calibration of the equipment used with the test, such as the pipettes and absorbance microplate reader, is required.
26. If a microplate shaker is required for the assay procedure, the type and speed of shaker required is stated in the REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED section. Both the type and speed of shaker used can influence the optical densities and test results. If a different type of shaker and/or speed is used, the user is responsible for validating the performance of the kit.
27. Do not reuse the microplate wells, they are for SINGLE USE only.
28. To avoid condensation within the microplate wells in humid environments, do not open the pouch containing the microplate until it has reached room temperature.
29. 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.
30. Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the European Member State in which the user and/or the patient is established.

6 SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

6.1 BIOHAZARDS

The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions applied to blood specimens. All human specimens should be considered a potential biohazard and handled as if capable of transmitting infections and in accordance with good laboratory practices.

The calibrators and controls provided with the kit contain processed human serum/plasma that has been tested by approved methods and found to be negative for the presence of HBsAg and antibodies to HCV, HIV 1/2 and HIV NAT. However, no test method can offer complete assurance that any viable pathogens are absent. Therefore, these components should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen, following good laboratory practices.

6.2 CHEMICAL HAZARDS

Avoid direct contact with any of the kit reagents. Specifically avoid contact with the TMB Substrate (contains tetramethylbenzidine) and Stopping Solution (contains sulfuric acid). If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water and refer to SDS for additional information.

7 SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND PRE-TREATMENT

7.1 SPECIMEN COLLECTION & STORAGE

Approximately 0.1 mL of serum is required per duplicate determination. Collect 4 - 5 mL of venous blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge at room temperature and carefully transfer the serum into a new storage tube or container. Serum samples may be stored at room temperature for up to seven days, at 2 °C – 8 °C for up to fourteen days or freeze at or below -20 °C for up to 1 month.

Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

7.2 SPECIMEN PRE-TREATMENT

Specimen pre-treatment is not required.

8 REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated single-channel pipette to dispense 50 µL.
2. Calibrated multi-channel pipettes to dispense 50 µL, 100 µL and 150 µL.
3. Calibrated multi-channel pipettes to dispense 350 µL (if washing manually).
4. Automatic microplate washer (recommended).
5. Disposable pipette tips.
6. Distilled or deionized water.
7. Calibrated absorbance microplate reader with a 450 nm filter and an upper OD limit of 3.0 or greater.

9 REAGENTS PROVIDED

Quantity	Symbol	Component
1 x 12 x 8	MTP	**Microtiter Plate** Ready to use One anti-DHT polyclonal antibody-coated 96-well (12x8) microplate in a resealable pouch with desiccant. Storage at 2 °C - 8 °C. Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After opening: Stable for four weeks at 2 °C - 8 °C.
1 x 15 mL	ENZCONJ	**Enzyme Conjugate** Ready to use Containing DHT-Horse Radish Peroxidase (HRP) conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Storage at 2 °C - 8 °C. Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After opening: Stable for four weeks at 2 °C - 8 °C.
1 x 7 x 1.0 mL	CAL A-G	**Standards / Calibrators A-G** Ready to use. Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations. 0, 25; 100; 250; 500; 1000; 2500 pg/mL Containing DHT in a human serum-based matrix with a non-mercury preservative. Prepared by spiking matrix with defined quantities of DHT. Storage at 2 °C - 8 °C. Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After opening: Stable for four weeks at 2 °C - 8 °C.
1 x 2 x 1.0 mL	CONTROL HIGH CONTROL LOW	**Control High** and **Control Low** Ready to use. Containing DHT in a human serum-based matrix with a non-mercury preservative. Prepared by spiking matrix with defined quantities of DHT. Refer to vial labels for the acceptable ranges. Storage at 2 °C - 8 °C. Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After opening: Stable for four weeks at 2 °C - 8 °C.
1 x 18 mL	TMB SUBS	**TMB Substrate Solution** Ready to use. Containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer. Storage at 2 °C - 8 °C. Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After opening: Stable for four weeks at 2 °C - 8 °C.
1 x 8 mL	TMB STOP	**TMB Stop Solution** Ready to use. Containing 1 M H_2SO_4. Storage at 2 °C - 8 °C. Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After opening: Stable for four weeks at 2 °C - 8 °C.
2 x 50 mL	WASHBUF CONC	**Wash Buffer,** Concentrate (10x) Requires Preparation Containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative. Storage at 2 °C - 8 °C. Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After opening: Stable for four weeks at 2 °C - 8 °C. Following Preparation: The working wash buffer is stable for 2 weeks following preparation, assuming Good Laboratory Practices are adhered to. To prevent microbial growth, prepare the wash buffer working solution in a clean container and store under refrigerated conditions (2 °C – 8 °C) when not in use. To **prepare the working wash buffer** that is used for washing the microplate, dilute the wash buffer concentrate 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole microplate is to be used, add 50 mL of the wash buffer concentrate to 450 mL of deionized or distilled water.

10 ASSAY PROCEDURE

Specimen Pre-Treatment: **None**.

All kit components, controls and specimen samples must reach room temperature prior to use. Calibrators, controls and specimen samples should be assayed in duplicate.

Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. After all kit components have reached room temperature, mix gently by inversion.
2. Prepare the working wash buffer (See the Reagents Provided section, Wash Buffer Concentrate).
3. Plan the microplate wells to be used for calibrators, controls, and samples. See Recommended Assay Layout section.
   Remove the strips that will not be used from the microplate frame and place them in the bag with desiccant. Reseal the bag with the unused strips and return it to the refrigerator.
4. Pipette **50 µL of each Calibrator, Control, and specimen sample** into correspondingly labelled wells in duplicate.
5. Pipette **100 µL of the Enzyme Conjugate** into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
6. Gently tap the microplate frame for 10 seconds to mix the contents of the wells and incubate the microplate at room temperature (no shaking) for **90 minutes**.
7. **Wash the wells** either with an automatic microplate washer (preferred) or manually as stated below.
   Automatic: Using an automatic microplate washer, perform a 3-cycle wash using 350 µL/well of Wash Buffer Working Solution (3 x 350 µL). One cycle consists of aspirating all wells then filling each well with 350 µL of Wash Buffer Working Solution. After the final wash cycle, aspirate all wells and then tap the microplate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid.

   Manually: For manual washing, perform a 3-cycle wash using 350 µL/well of Wash Buffer Working Solution (3 x 350 µL). One cycle consists of aspirating all wells by briskly emptying the contents of the wells over a waste container, then pipetting 350 µL of Wash Buffer Working Solution into each well using a multi-channel pipette. After the final wash cycle, aspirate all wells by briskly emptying the contents over a waste container and then tap the microplate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid.
8. Pipette **150 µL of TMB Substrate** into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
9. Incubate the microplate at room temperature (no shaking) for **30 minutes**.
10. Pipette **50 µL of TMB Stop Solution** into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended) in the same order and speed as was used for addition of the TMB Substrate Solution. Gently tap the microplate frame to mix the contents of the wells.
11. **Measure** the optical density (absorbance) in the microplate wells using an absorbance microplate reader set to 450 nm, within 20 minutes after addition of the TMB Stop Solution.

11 CALCULATIONS

1. Calculate the mean optical density for each calibrator, control, and specimen sample duplicate.
2. Use a 4-parameter or 5-parameter curve fit with immunoassay software to generate a calibrator curve.
3. The immunoassay software will calculate the concentrations of the controls and specimen samples using the mean optical density values and the calibrator curve.
4. If a sample reads more than 2500 pg/mL and needs to be diluted and retested, then dilute with a serum sample with a known low DHT concentration (< 50 pg/mL) not more than 1:10. The result obtained must be multiplied by the dilution factor.

12 QUALITY CONTROL

When assessing the validity of the test results, the following criteria should be evaluated:

1. The calibrator A mean optical density meets the acceptable range as stated in the QC Certificate.
2. The calibrator with the highest concentration meets the % binding acceptable range as stated in the QC Certificate.
   % Binding = (OD of calibrator/OD of calibrator A) x 100.
3. The values obtained for the kit controls are within the acceptable ranges as stated in the QC certificate.
4. The results of any external controls that were used meet the acceptable ranges.

13 TYPICAL DATA

13.1 TYPICAL TABULATED DATA

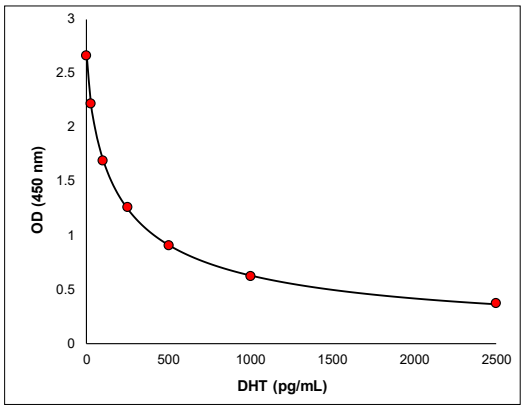
Sample data only. **Do not** use to calculate results.

Calibrator	Mean OD (450 nm)	% Binding	Value (pg/mL)
A	2.664	100 %	0 pg/mL
B	2.225	84 %	25 pg/mL
C	1.695	64 %	100 pg/mL
D	1.261	47 %	250 pg/mL
E	0.911	34 %	500 pg/mL
F	0.622	23 %	1000 pg/mL
G	0.372	14 %	2500 pg/mL
Unknown	1.077	40 %	353 pg/mL

13.2 TYPICAL CALIBRATOR CURVE

Sample curve only.

Do not use to calculate results.



14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 SENSITIVITY

The analytical sensitivity study was performed according to the CLSI EP17-A2 guideline. Sixty replicates of the matrix and low concentration samples were run in independent tests with three lots of the kit. The Limit of Background (LoB) was determined to be 9.4 pg/mL, the Limit of Detection (LoD) was determined to be 17.0 pg/mL and the Limit of Quantitation (LoQ) was determined to be 17.0 pg/mL.

14.2 SPECIFICITY (CROSS-REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with DHT cross-reacting at 100 %.

Compound	% Cross-Reactivity
5α-DHT	100 %
17-hydroxyprogesterone	< 0.01 %
17β-estradiol	< 0.01 %
Aldosterone	< 0.01 %
Androstenedione	0.6 %
Corticosterone	< 0.01 %
Cortisol	< 0.01 %
Danazol	< 0.01 %
DHEAS	< 0.01 %
Estriol	< 0.01 %
Estrone	< 0.01 %
Ethisterone	0.03 %
Pregnenolone	< 0.01 %
Progesterone	< 0.01 %
Testosterone	8.1 %

14.3 INTERFERENCES

An interference study was performed according to the CLSI EP07-A2 guideline.
No significant interference was observed for concentrations of up to 10 g/L Haemoglobin, 10 mg/dL Bilirubin (conjugated and unconjugated), 1500 mg/dL Triglycerides, 2.4 µg/mL Biotin, 1.2 µg/mL HAMAS and 2531 IU/mL Rheumatoid Factor.
Interferences were observed for both bilirubin conjugated and unconjugated at levels of 20 mg/dL or higher.

14.4 PRECISION

The precision study was performed according to the CLSI EP05-A2 guideline.

Repeatability
The experimental protocol used a nested components-of-variance design with 7 serum samples, 10 testing days, two lots and two scientists per day. Each scientist ran two tests per day and two replicate measurements per run (a 10 x 2 x 2 x 2 design) for each sample.
The results were analyzed with a two-way nested ANOVA and summarized in the table below.

Sample	Mean	SD Within Run	CV Within Run	SD Between Run	CV Between Run	Total SD	CV Total
1	31.4 pg/mL	13.7 pg/mL	43.7 %	3.3 pg/mL	10.5 %	14.1 pg/mL	44.9 %*
2	144.2 pg/mL	19.3 pg/mL	13.4 %	8.5 pg/mL	5.9 %	21.0 pg/mL	14.6 %
3	817.5 pg/mL	51.7 pg/mL	6.3 %	21.1 pg/mL	2.6 %	55.8 pg/mL	6.8 %
4	429.5 pg/mL	34.5 pg/mL	8.0 %	10.8 pg/mL	2.5 %	36.8 pg/mL	8.6 %
5	586.2 pg/mL	38.8 pg/mL	6.6 %	15.5 pg/mL	2.6 %	41.8 pg/mL	7.1 %
6	1561 pg/mL	90.0 pg/mL	5.8 %	24.1 pg/mL	1.5 %	94.5 pg/mL	6.1 %
7	1287 pg/mL	71.1 pg/mL	5.5 %	18.5 pg/mL	1.4 %	73.4 pg/mL	5.7 %

* Samples that are close to the limit of quantitation are expected to have a higher imprecision.
The allowable total error for samples lower than 145 pg/mL is ± 30 pg/mL.[6]

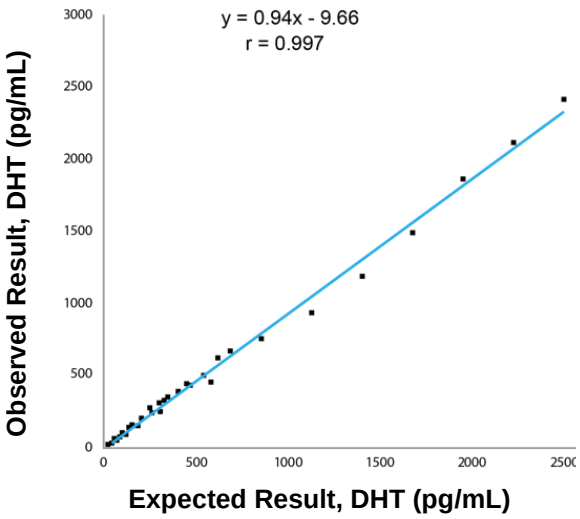
Reproducibility
The reproducibility study evaluated the precision performance of the device following experimental design model 3 x 5 x 5 (3 locations x five testing days x five replicates per day) across laboratories located in Italy, the USA and Canada. The results were analyzed with a two-way nested ANOVA and are summarized in the table below.

Sample	Mean	Repeatability		Within Location		Reproducibility	
		SD	CV	SD	CV	SD	CV
QCL	129.4 pg/mL	5.5 pg/mL	4.3 %	6.5 pg/mL	5.1 %	7.5 pg/mL	5.8 %
QCH	411.8 pg/mL	14.5 pg/mL	3.5 %	18.4 pg/mL	4.5 %	19.8 pg/mL	4.8 %
1	65.4 pg/mL	4.4 pg/mL	6.7 %	5.7 pg/mL	8.8 %	10.7 pg/mL	16.4 %
2	189.7 pg/mL	8.5 pg/mL	4.5 %	17.7 pg/mL	9.3 %	33.5 pg/mL	17.7 %
3	228.2 pg/mL	8.8 pg/mL	3.9 %	15.7 pg/mL	6.9 %	30.6 pg/mL	13.4 %
4	390.4 pg/mL	12.1 pg/mL	3.1 %	31.1 pg/mL	8.0 %	38.0 pg/mL	9.7 %
5	655.8 pg/mL	18.7 pg/mL	2.8 %	38.3 pg/mL	5.8 %	63.8 pg/mL	9.7 %
6	883.2 pg/mL	26.4 pg/mL	3.0 %	55.4 pg/mL	6.3 %	128.1 pg/mL	14.5 %

14.5 LINEARITY

The linearity study was performed according to the CLSI EP06-Ed2 guideline using four human serum samples covering the range of the assay (between 226 and 2500 pg/mL).

The samples were diluted in serum samples with a low concentration of DHT (less than 50 pg/mL) at several equidistant concentration levels and up to ten percent (1:10), tested in duplicate, and the results compared to the predicted concentration. The statistical analysis shows that the assay is sufficiently linear up to a 1:10 dilution.



14.6 RECOVERY

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of DHT (present in serum samples with a high DHT concentration) to four serum samples. The results (in pg/mL) are tabulated below:

Sample	Concentration Result	Concentration of Spiking Samples	Expected Concentration from 9:1 v/v	Recovery
1	**91.3 pg/mL**	-	-	-
	177.3 pg/mL	800 pg/mL	162.2 pg/mL	109.3 %
	230.2 pg/mL	1472 pg/mL	229.4 pg/mL	100.3 %
	313.8 pg/mL	2672 pg/mL	349.4 pg/mL	89.8 %
2	**191.6 pg/mL**	-	-	-
	261.0 pg/mL	800 pg/mL	252.5 pg/mL	103.4 %
	306.2 pg/mL	1472 pg/mL	319.7 pg/mL	95.8 %
	408.0 pg/mL	2672 pg/mL	439.7 pg/mL	92.8 %
3	**379.5 pg/mL**	-	-	-
	433.2 pg/mL	800 pg/mL	421.6 pg/mL	102.7 %
	499.5 pg/mL	1472 pg/mL	488.8 pg/mL	102.2 %
	573.3 pg/mL	2672 pg/mL	608.8 pg/mL	94.2 %
4	**360.2 pg/mL**	-	-	-
	383.2 pg/mL	800 pg/mL	404.2 pg/mL	94.8 %
	461.8 pg/mL	1472 pg/mL	471.4 pg/mL	98.0 %
	510.8 pg/mL	2672 pg/mL	591.4 pg/mL	86.4 %

14.7 COMPARATIVE STUDIES

The 5α Dihydrotestosterone (DHT) ELISA (y) was compared to a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry DHT method (x).

The comparison of 90 serum samples yielded the following linear regression results using a Passing-Bablok fit:

$y = 0.78x + 73.8$, $r = 0.88$

15 REFERENCE RANGES

Reference ranges (95%) were estimated using samples obtained from adult individuals of diverse origins.
Each laboratory shall establish their own range of reference values.

Cohort	n	Median	95% Reference Range
Adult Males (20 – 89 years old)	304	380 pg/mL	143 – 842 pg/mL
Adult Females (18 – 50 years old)	183	91 pg/mL	ND – 596 pg/mL
Adult Females (51 – 83 years old)	135	53 pg/mL	ND – 431 pg/mL

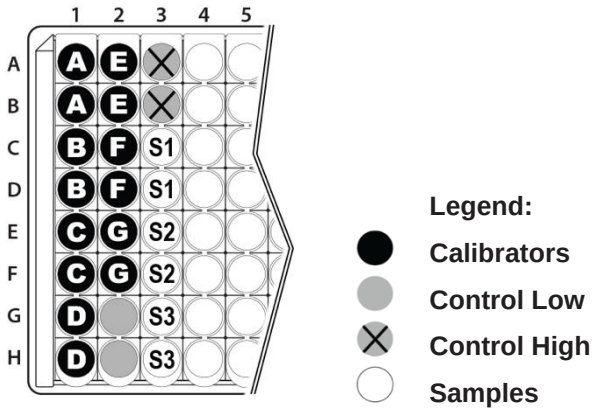
ND = Not detectable; lower than the LoD

Reference ranges were estimated using pediatric samples as shown below. Due to the limited sample size, a 95% reference range could not be established; the total range is provided. Each laboratory shall establish their own range of reference values.

Gender	Age	n	Total Range
Male	1 – 9 years	40	ND – 85.7 pg/mL
	10 – 14 years	26	11.1 – 875.6 pg/mL
	15 – 18 years	14	70.3 – 1260.9 pg/mL
Female	2 – 9 years	40	ND – 88.9 pg/mL
	10 – 14 years	21	22.5 – 280.6 pg/mL
	15 – 18 years	19	62.6 – 760.3 pg/mL

ND = Not detectable; lower than the LoD

16 RECOMMENDED ASSAY LAYOUT



1 BESTIMMUNGSZWECK UND ANWENDUNG

Für die quantitative Messung von Dihydrotestosteron (DHT) in Humanserum mittels ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Dieser Test ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt und darf nur im Labor verwendet werden. **Nur für die In-vitro-Diagnostik geeignet.**
Er ist für die manuelle Anwendung vorgesehen, kann aber auch an offene automatische Analysegeräte angepasst werden. Der Benutzer ist für die Validierung der Leistung dieses Kits mit automatisierten Analysegeräten verantwortlich.

2 EINSCHRÄNKUNGEN IN BEZUG AUF DEN BESTIMMUNGSGEMÄSSEN ZWECK UND GEBRAUCH

1. Dieser Test ist nicht für Screening-Zwecke vorgesehen.
2. Dieser Test ist nicht für Heimtests oder Selbsttests vorgesehen.
3. Der Kit ist für die Bestimmung von DHT in Humanserum kalibriert. Der Test ist nicht für die Bestimmung von DHT in anderen Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs kalibriert.
4. Die mit diesem Kit erzielten Ergebnisse dürfen niemals als alleinige Grundlage für eine klinische Diagnose und für therapeutische Entscheidungen verwendet werden.
5. Obwohl gängige Störsubstanzen mit diesem Test evaluiert wurden, können andere Substanzen, die nicht evaluiert wurden, wie z. B. Medikamente und das Auftreten von heterophilen Antikörpern bei Personen, die regelmäßig mit Tieren oder tierischen Produkten in Kontakt kommen, Störungen verursachen.

3 ERGÄNZENDE INFORMATIONEN

Dihydrotestosteron (DHT) ist das aktivste natürliche Androgen des Menschen und spielt eine Hauptrolle bei der Entwicklung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale und ist möglicherweise an einer Vielzahl anderer physiologischer Prozesse beteiligt. Der Großteil der Androgenproduktion findet hauptsächlich in den Leydig-Zellen des Hodens statt. Androgene zirkulieren im Blut an Proteine gebunden, insbesondere an Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG) aus der peripheren Umwandlung von Testosteron, während bei Frauen der größte Teil des DHT aus Androstendion gewonnen wird.

Einige der wichtigsten klinischen Indikationen für die DHT-Bestimmung im Serum sind Untersuchungen der verzögerten Pubertät bei Männern und die Bewertung des Vorhandenseins von aktivem Testikulargewebe[1].

4 TESTPRINZIP

Der 5alpha-Dihydrotestosterone ELISA ist ein kompetitiver Immunoassay. DHT, das in Kalibratoren, Kontrollen, Proben und einem enzymmarkierten Antigen (HRP-Konjugat) vorhanden ist, konkurriert um eine begrenzte Anzahl von Anti-DHT-Antikörper-Bindungsstellen in den Vertiefungen der Mikroplatte. Nach einem Waschschritt, bei dem ungebundene Materialien entfernt werden, wird das TMB-Substrat (Enzymsubstrat) zugegeben, das mit HRP reagiert und ein blau gefärbtes Produkt bildet, das umgekehrt proportional zur Menge des vorhandenen DHT ist. Nach der Inkubation wird die enzymatische Reaktion durch Zugabe der Stopplösung beendet, wodurch die Farbe von blau nach gelb umschlägt. Die Absorption wird auf einem Mikroplatten-Lesegerät bei 450 nm gemessen. Mit einer Reihe von Kalibratoren wird eine Kalibrierkurve erstellt, aus der die DHT-Menge in den Proben und Kontrollen direkt abgelesen werden kann.

5 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Dieses Testkit ist für den Gebrauch durch geschultes Laborpersonal bestimmt (nur für den professionellen Gebrauch). Nur für den In-vitro-Gebrauch im Labor.
2. Beim Umgang mit den Reagenzien und Proben des Testkits ist gute Laborpraxis (GLP) zu beachten. Dies beinhaltet:
   - Nicht mit dem Mund pipettieren.
   - In Bereichen, in denen mit Proben oder Kit-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, trinken oder essen.
   - Tragen von Schutzkleidung und Einweghandschuhe.
   - Nach Testdurchführung gründlich die Hände waschen.
   - Schutzbrille tragen; Kontakt zu Reagenzien vermeiden; bei Augenkontakt, die Augen sofort mit Wasser ausspülen und einen Arzt aufsuchen.
3. Anwender sollten dieses Protokoll vollständig verstanden haben, um diesen Kit erfolgreich zu gebrauchen. Zuverlässige Ergebnisse werden nur erzielt, wenn sich strikt und genau an die zur Verfügung gestellten Anweisungen gehalten wird.
4. Testkit nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden.
5. Wenn Reagenzien des Testkits sichtbar beschädigt sind, darf das Testkit nicht verwendet werden.
6. Keine Kitkomponenten aus verschiedenen Kit-Chargen mischen und keine Komponente nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
7. Alle Kitreagenzien und Proben müssen vor denm Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.
8. Wenn die Verwendung von Wasser für die Verdünnung oder Rekonstitution vorgeschrieben ist, ist deionisiertes oder destilliertes Wasser zu verwenden.

9. Unmittelbar nach dem Gebrauch müssen die einzelnen Bestandteile des Kits wieder bei der auf dem Etikett angegebenen empfohlenen Lagertemperatur gelagert werden.
10. Für jeden Lauf muss eine Kalibrierkurve erstellt werden.
11. Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu beurteilen, wird allen Kunden empfohlen, eigenes Kontrollmaterial oder Serumpools herzustellen und bei jedem Lauf in einer hohen und einer niedrigen Konzentration mitzuführen.
12. Die Kontrollen (im Kit enthalten) müssen bei jedem Durchlauf mitgeführt werden und die Ergebnisse müssen innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen. Nicht erfüllte Kontrollergebnise könnte auf unsachgemäße Verfahrenstechniken, Pipettierfehler, unvollständiges Waschen oder unsachgemäße Reagenzienlagerung hinweisen.
13. Beim Dispensieren der Substrat- und Stopplösungen dürfen keine Pipetten verwendet werden, in denen diese Flüssigkeiten mit Metallteilen in Kontakt kommen.
14. Die Substratlösung (TMB) ist lichtsensibel und sollte bei sachgemäßer Lagerung farblos bleiben. Instabilität oder Kontaminierung könnten zur Entwicklung einer bläulichen Farbe führen. Ist dies der Fall, sollte das Reagenz nicht benutzt werden.
15. Kein hämolysiertes, lipämisches, ikterisches oder unsachgemäß gelagertes Serum verwenden.
16. Proben oder Kontrollseren, die Azid oder Thimerosal enthalten, sind nicht mit diesem Kit kompatibel, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
17. Probenwerte, die über dem Messbereich des Kits liegen, können als >2500 pg/mL angegeben werden. Wenn eine weitere Verdünnung und erneute Testung erforderlich ist, dürfen nur Serumproben mit einer bekannt niedrigen DHT-Konzentration (< 50 pg/mL) zur Verdünnung der Serumproben verwendet werden. Die Verwendung eines anderen Reagenzes kann zu falschen Ergebnissen führen.
18. Eine mikrobielle Verunreinigung der Reagenzien ist zu vermeiden.
19. Um eine Verunreinigung der Reagenzien zu vermeiden, ist für jedes Reagenz, jede Probe, jeden Standard und jede Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
20. Reagenzien nicht in die Originalbehälter zurückfüllen, um Kontaminationen der Reagenzien zu vermeiden.
21. Reagenzien des Kits sind als Sondermüll zu betrachten und entsprechend den örtlichen und/oder nationalen Vorschriften zu entsorgen.
22. Die mit dem Kit verwendete Verbrauchsmaterialien, die potenziell biologisch gefährlich sind (z. B. Pipettenspitzen, Flaschen oder Behälter, die humanes Material enthalten), müssen gemäß den Biosicherheitspraktiken gehandhabt werden, um das Infektionsrisiko zu minimieren, und gemäß den örtlichen und/oder nationalen Vorschriften für biologisch gefährlichen Abfall entsorgt werden.
23. Dieser Kit enthält 1 M Schwefelsäure in der Stopplösung. Die Säure darf nicht mit Abfallmaterial kombiniert werden, das Natriumazid oder Natriumhypochlorit enthält.
24. Es wird dringend empfohlen, beim Umgang mit biologisch gefährlichen oder biokontaminierten Lösungen eine Schutzbrille und Einwegmaterial zu verwenden.
25. Für die Test verwendeten Geräte, wie z. B. Pipetten und Absorptionsmikroplatten-Reader, ist eine ordnungsgemäße Kalibrierung erforderlich.
26. Wird für das Testverfahren ein Mikroplattenschüttler benötigt, so sind Art und Geschwindigkeit des Schüttlers im Abschnitt ZUSÄTZLICHES MATERIAL (NICHT IM KIT ENTHALTEN) angeben. Sowohl die Art als auch die Geschwindigkeit des verwendeten Schüttlers können optische Dichte und Testergebnisse beeinflussen. Wird ein anderer Schüttlertyp und/oder eine andere Schüttelgeschwindigkeit verwendet, ist der Anwender dafür verantwortlich, die Leistung des Kits zu überprüfen.
27. Vertiefungen der Mikrotiterplatte dürfen nicht wiederverwendet werden, sie sind nur für den EINZELNEN GEBRAUCH vorgesehen.
28. Den Beutel der Mikrotiterplatte erst öffnen, wenn er Raumtemperatur erreicht hat, um Kondensation in den Wells der Mikrotiterplatte zu vermeiden.
29. Beim Lesen der Mikroplatte beeinträchtigt das Vorhandensein von Blasen in den Vertiefungen die optischen Dichten (ODs). Vor dem Ablesen sollten die Blasen vorsichtig entfernt werden.
30. Jeder schwerwiegende Zwischenfall im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des europäischen Mitgliedstaates, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

6 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

6.1 BIOLOGISCH GEFÄHRLICHES MATERIAL

Die Reagenzien sind als potentiell biologisch gefährlich zu betrachten und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie Blutproben zu behandeln. Alle human Proben sind als potentiell biologisch gefährlich zu betrachten und so zu behandeln, als ob sie Infektionen übertragen könnten, in Übereinstimmung mit GLP (good laboratory practices).

Die mit dem Kit gelieferten Standards und Kontrollen enthalten aufbereitetes human Serum/Plasma, das mit anerkannten Methoden getestet wurde und sich als negativ für das Vorhandensein von HBsAg und Antikörpern gegen HCV, HIV 1/2 und HIV NAT erwiesen hat. Keine Testmethode kann jedoch eine vollständige Sicherheit bieten, dass keine lebensfähigen Krankheitserreger vorhanden sind. Daher sind diese Bestandteile als potenzielle biologisch gefährlich zu betrachten und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln, wie sie für jede Blutprobe gelten, wobei GLP zu beachten ist.

6.2 CHEMISCHE GEFAHREN

Ein direkter Kontakt mit allen Reagenzien des Kits ist zu vermeiden, insbesondere mit TMB-Substrat (enthält Tetramethylbenzidin) und Stopplösung (enthält Schwefelsäure). Nach einem Kontakt, mit reichlich Wasser abwaschen, weitere Informationen finden sich im Sicherheitstatenblatt.

7 PROBENGEWINNUNG, AUFBEWAHRUNG UND PROBENVORBEREITUNG

7.1 PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG

Für eine Doppelbestimmung werden ca. 0.1 mL Serum benötigt. Hierfür 4 - 5 mL venöses Blut in einem dafür vorgesehenen und entsprechend markiertem Röhrchen sammeln und das Blut gerinnen lassen.

Bei Raumtemperatur zentrifugieren und vorsichtig das Serum in ein neues Röhrchen oder Gefäß überführen. Serumproben können bei Raumtemperatur bei 2 - 8°C bis zu 3 Tage, bei -20°C bis zu 7 Tage der darunter bis zu 1 Monat gelagert werden.

Alle humanen Proben sind als potentiell biologisch gefährliches Material zu behandeln und bei der Handhabung sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen zu treffen.

7.2 PROBENVORBEREITUNG

Es ist keine Probenvorbehandlung notwendig.

8 ZUSÄTZLICHES MATERIAL (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

1. Kalibrierte Einkanalpipette zur Dosierung von 50 µL.
2. Kalibrierte Mehrkanalpipette zur Dosierung von 50 µL, 100 µL und 150 µL.
3. Kalibrierte Mehrkanalpipette zur Dosierung von 350 µL (nur für manuelles Waschen).
4. Automatischer Mikroplattenwascher (empfohlen).
5. Einweg-Pipettenspitzen
6. Destilliertes oder entionisiertes Wasser
7. Mikrotiterplattenleser mit einem Filtersatz bei 450 nm und einer oberen OD-Grenze von 3,0 oder höher

9 KOMPONENTEN DES KITS

Anzahl / Menge	Symbol	Komponente
1 x 12 x 8	MTP	**Mikrotiterplatte** Gebrauchsfertig Eine anti-DHT polyklonal-Antikörper beschichtete 96-Well (12 x 8) Mikrotiterplatte, in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel. Lagerung bei 2 °C - 8 °C. Stabilität ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen bei 2 °C - 8 °C haltbar.
1 x 15 mL	ENZCONJ	**Enzymkonjugat,** Gebrauchsfertig Enthält DHT-Horse Radish Peroxidase (HRP) Konjugat in Protein-Puffer, quecksilberfreie Konservierungsmittel. Lagerung bei 2 °C - 8 °C. Stabilität ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen bei 2 °C - 8 °C haltbar.
1 x 7 x 1.0 mL	CAL A-G	**Standard A-G** Gebrauchsfertig. Die folgenden Angaben sind ungefähre Konzentrationen, <u>die genauen Konzentrationen sind auf den Etiketten der Fläschchen angegeben</u>. 0, 25; 100; 250; 500; 1000; 2500 pg/mL Enthält DHT in einer auf Humanserum basierenden Matrix mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel. Hergestellt durch Aufstockung der Matrix mit definierten DHT-Mengen. Lagerung bei 2 °C - 8 °C. Stabilität ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen bei 2 °C - 8 °C haltbar.
1 x 2 x 1.0 mL	CONTROL HIGH CONTROL LOW	**Kontrolle Hoch** und **Kontrolle Niedrig** Gebrauchsfertig. Enthält DHT in einer auf Humanserum basierenden Matrix mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel. Hergestellt durch Aufstockung der Matrix mit definierten DHT-Mengen. <u>Die zulässigen Bereiche sind den Etiketten der Fläschchen zu entnehmen.</u> Lagerung bei 2 °C - 8 °C. Stabilität ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen bei 2 °C - 8 °C haltbar.
1 x 18 mL	TMB SUBS	**TMB Substratlösung** Gebrauchsfertig. Enthält Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem DMF- oder DMSO-freien Puffer. Lagerung bei 2 °C - 8 °C. Stabilität ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen bei 2 °C - 8 °C haltbar.
1 x 8 mL	TMB STOP	**TMB Stopplösung** Gebrauchsfertig. Enthält: 1 M H_2SO_4. Lagerung bei 2 °C - 8 °C. Stabilität ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen bei 2 °C - 8 °C haltbar.
2 x 50 mL	WASHBUF CONC	**Waschpuffer, Konzentrat (10 x)** Erfordert eine Vorbereitung Enthält: Puffer mit nicht-ionischem Detergent und quecksilberfreie Konservierungsmittel. Lagerung bei 2 °C - 8 °C Stabilität ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen bei 2 °C - 8 °C haltbar. <u>Nach der Zubereitung:</u> Der Arbeits-Waschpuffer ist nach der Zubereitung 2 Wochen lang stabil, vorausgesetzt, GLP wird eingehalten. Um mikrobielles Wachstum zu verhindern, sollte der Behälter, in dem die Arbeits-Waschpufferlösung zubereitet und aufbewahrt wird, sauber sein, und es wird empfohlen, die Arbeits-Waschpufferlösung gekühlt (2 °C - 8 °C) zu lagern, wenn sie nicht verwendet wird. **Vorbereitung des Waschpuffers:** Zur Herstellung des Arbeitspuffers, der zum Waschen der Mikroplatte verwendet wird, vor der Verwendung das Waschpufferkonzentrat <u>**1:10** in destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen</u>. Wenn die gesamte Mikroplatte verwendet werden soll, dann zu 50 mL Waschpufferkonzentrat, 450 mL deionisiertes oder destilliertes Wasser hinzufügen.

10 TESTDURCHFÜHRUNG

Probenvorbehandlung: **Keine.**

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch Raumtemperatur erreicht haben. Standards, Kontrollen und Proben sollten in Doppelbestimmungen durchgeführt werden. Ist der Test einmal gestartet, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.

1. Nachdem alle Komponenten des Kits Raumtemperatur erreicht haben, durch vorsichtiges Umdrehen mischen.
2. Waschpuffer Arbeitslösungen herstellen. (Siehe Komponenten des Kits, Waschpuffer Konzentrat).
3. Belegung der Mikrotiterplatte, die für Kalibratoren, Kontrollen und Proben festlegen. Siehe Abschnitt Empfohlenes Assay-Layout.
   Benötigte Anzahl der Mikrotiterstreifen entnehmen. Beutel mit ungenutzten Streifen gut verschließen und zurück in den Kühlschrank legen.
4. **50 µL von jedem Standard, jeder Kontrolle und Probe** in die entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte in Doppelbestimmungen pipettieren.
5. Je **100 µL Enzymkonjugat** in jedes Well pipettieren (Verwendung einer Mehrkanalpipette empfohlen).
6. Platte kurz schütteln (10 Sekunden), ohne schütteln **90 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren
7. Vertiefungen entweder mit einem automatischen Mikroplattenwaschgerät (bevorzugt) oder manuell wie nachfolgend beschrieben **waschen**.
   Automatisch: Mit einem automatischen Mikroplattenwaschgerät einen 3-fachen Waschzyklus mit 350 µL/Well Waschpuffer-Arbeitslösung (3 x 350 µL) durchführen. Ein Zyklus besteht aus Absaugen aller Vertiefungen und anschließenden Befüllen jeder Vertiefung mit 350 µL Waschpuffer-Arbeitslösung. Nach dem letzten Waschzyklus sind alle Vertiefungen abzusaugen und dann die Mikroplatte fest gegen saugfähiges Papier auszuklopfen, um Flüssigkeitsreste zu entfernen.

   Manuell: Beim manuellen Waschen werden 3 Waschzyklen mit 350 µL/Well der Waschpuffer-Arbeitslösung (3 x 350 µL) durchgeführt. Ein Zyklus besteht darin, alle Vertiefungen zu leeren, indem der Inhalt der Vertiefungen zügig über einen Abfallbehälter ausgeschüttet wird, um dann 350 µL der Waschpuffer-Arbeitslösung mit einer Mehrkanalpipette in jede Vertiefung zu pipettieren. Nach dem letzten Waschzyklus sind alle Vertiefungen zu leeren, indem der Inhalt zügig über einem Abfallbehälter ausgeschüttet wird und die Mikroplatte anschließend fest gegen saugfähiges Papier geklopft wird, um Flüssigkeitsreste zu entfernen.
8. Je **150 µL TMB Substratlösung** in jedes Well pipettieren (Verwendung einer Mehrkanalpipette empfohlen).
9. Mikroplatte **30 Minuten** lang bei Raumtemperatur inkubieren (nicht schütteln).
10. Je **50 µL Stopplösung**, in der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit wie bei der Zugabe des TMB-Substrats, in jede Vertiefung pipettieren (die Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen). Durch vorsichtiges Klopfen auf den Mikroplattenrahmen den Inhalt der Vertiefungen mischen.
11. Die optische Dichte (Absorption), in den Vertiefungen der Mikroplatte, mit einem auf 450 nm eingestellten Absorptions-Mikroplattenlesegerät, innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe der Stopplösung **messen**.

11 TESTAUSWERTUNG

1. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standards, jeder Kontrolle und jeder Probe.
2. Verwenden Sie eine 4-Parameter- oder 5-Parameter-Kurvenanpassung mit einer Immunoassay-Software, um eine Kalibratorkurve zu erstellen.
3. Die Software berechnet die Konzentrationen der Kontrollen und Proben anhand der mittleren Werte der optischen Dichte und der Kalibrierkurve.
4. Wenn eine Probe mehr als 2500 pg/mL anzeigt, kann diese mit einer Serumprobe mit bekannt niedrigem Wert (< 50 pg/mL), in einem Verhältnis kleiner als 1:10 verdünnt werden. Das erhaltene Ergebnis muss mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

12 QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Beurteilung der Gültigkeit der Testergebnisse sollten die folgenden Kriterien geprüft werden:

1. Die mittlere optische Dichte des Standard A entspricht dem im QC-Zertifikat angegebenen Akzeptanzbereich.
2. Der Standard mit der höchsten Konzentration entspricht dem im QC-Zertifikat angegebenen Akzeptanzbereich für die %-Bindung. % Bindung = (OD des Standards/OD des Standard A) x 100.
3. Die für die Kitkontrollen erhaltenen Werte liegen innerhalb der im QC-Zertifikat angegebenen akzeptablen Bereiche.
4. Die Ergebnisse der verwendeten externen Kontrollen liegen innerhalb der zulässigen Bereiche.

13 TYPISCHE WERTE

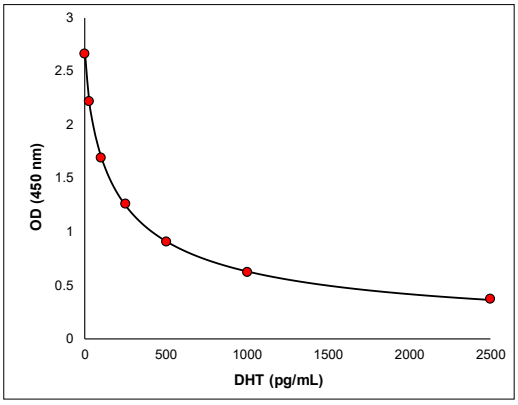
13.1 TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Nur Beispieldaten. **Nicht** zur Berechnung von Ergebnissen verwenden.

Standard	$OD_{Mittelwert}$ (450 nm)	% Bindung	Wert
A	2,664	100 %	0 pg/mL
B	2,225	84 %	25 pg/mL
C	1,695	64 %	100 pg/mL
D	1,261	47 %	250 pg/mL
E	0,911	34 %	500 pg/mL
F	0,622	23 %	1000 pg/mL
G	0,372	14 %	2500 pg/mL
Unbekannt	1,077	-	353 pg/mL

13.2 Typische Standardkurve

Beispiel. **Nicht** zur Testauswertung verwenden!



14 TESTCHARAKTERISTIKA

14.1 SENSITIVITÄT

Die analytische Empfindlichkeitsstudie wurde gemäß der CLSI EP17-A2-Richtlinie durchgeführt. Sechzig Wiederholungene der Matrix- und Niedrigkonzentrationsproben wurden in unabhängigen Tests mit drei Chargen des Kits durchgeführt. Die Hintergrundgrenze (Limit of Background, LoB) wurde mit 9.4 pg/mL, die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) mit 17.0 pg/mL und die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LoQ) mit 17.0 pg/mL bestimmt.

14.2 SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Folgende Verbindungen wurden auf ihre Kreuzreaktivität getestet, wobei 5α-DHT 100% Kreuzreaktivität hat.

Komponente	% Kreuzreaktivität
5α-DHT	100 %
17-hydroxyprogesteron	<0.01 %
17β-estradiol	<0.01 %
Aldosteron	<0.01 %
Androstenedion	0.6 %
Corticosteron	<0.01 %
Cortisol	<0.01 %
Danazol	<0.01 %
DHEAS	<0.01 %
Estriol	<0.01 %
Estron	<0.01 %
Ethisteron	0.03 %
Pregnenolon	<0.01 %
Progesteron	<0.01 %
Testosteron	8.1 %

14.3 INTERFERENZEN

Es wurde eine Interferenzstudie gemäß der CLSI EP07-A2-Richtlinie durchgeführt.
Bei Konzentrationen von bis zu 10 g/L Hämoglobin, 10 mg/dL Bilirubin (konjugiert und unkonjugiert), 1500 mg/dL Triglyceride, 2.4 µg/mL Biotin, 1.2 µg/mL HAMAS und 2531 IU/mL Rheumafaktor wurden keine signifikanten Interferenzen beobachtet.
Interferenzen wurden sowohl für konjugiertes als auch für unkonjugiertes Bilirubin bei Werten von 20 mg/dL oder höher beobachtet.

14.4 PRÄZISION

Es wurde eine Studie zur Präzision gemäß EP05-A2 durchgeführt.

Wiederholbarkeit

Das Versuchsprotokoll verwendete ein verschachteltes Varianzkomponenten-Design mit 7 Serumproben, 10 Testtagen, zwei Chargen und zwei wissenschaftliche Fachkräfte pro Tag. Jede Fachkraft führte zwei Tests mit zwei Chargen pro Tag und zwei Wiederholungsmessungen pro Durchgang durch (ein 10 x 2 x 2 x 2 Design) für jede Probe. Die Ergebnisse wurden mit einer verschachtelten Zwei-Wege-ANOVA analysiert und sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	Mittelwert	SD innerhalb Serie	VK innerhalb Serie	SD zwischen den Läufen	VK zwischen den Läufen	Total SD	Total VK
1	31,4 pg/mL	13,7 pg/mL	43,7 %	3,3 pg/mL	10,5 %	14,1 pg/mL	44,9 %*
2	144,2 pg/mL	19,3 pg/mL	13,4 %	8,5 pg/mL	5,9 %	21,0 pg/mL	14,6 %
3	817,5 pg/mL	51,7 pg/mL	6,3 %	21,1 pg/mL	2,6 %	55,8 pg/mL	6,8 %
4	429,5 pg/mL	34,5 pg/mL	8,0 %	10,8 pg/mL	2,5 %	36,8 pg/mL	8,6 %
5	586,2 pg/mL	38,8 pg/mL	6,6 %	15,5 pg/mL	2,6 %	41,8 pg/mL	7,1 %
6	1561 pg/mL	90,0 pg/mL	5,8 %	24,1 pg/mL	1,5 %	94,5 pg/mL	6,1 %
7	1287 pg/mL	71,1 pg/mL	5,5 %	18,5 pg/mL	1,4 %	73,4 pg/mL	5,7 %

* Bei Proben, nahe an der Bestimmungsgrenze, ist mit einer höheren Ungenauigkeit zu rechnen.
Der zulässige Gesamtfehler für Proben mit weniger als 145 pg/ml beträgt ± 30 pg/ml.[6]

Reproduzierbarkeit

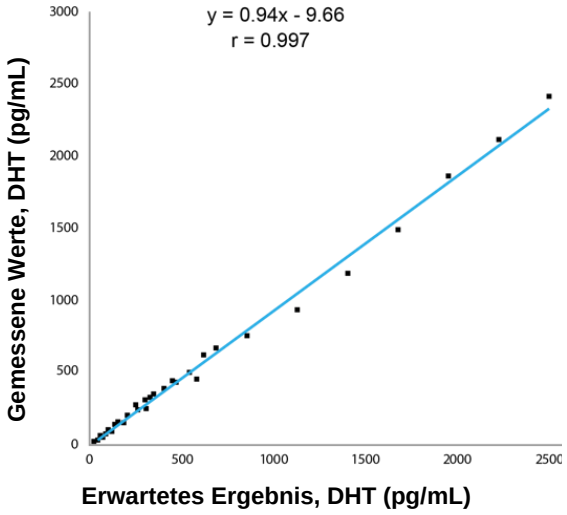
In der Reproduzierbarkeitsstudie wurde die Präzisionsleistung nach dem Versuchsplanmodell 3 x 5 x 5 (3 Standorte x fünf Testtage x fünf Wiederholungen pro Tag) in Labors in Italien, den USA und Kanada bewertet. Die Ergebnisse wurden mit einer verschachtelten Zwei-Wege-ANOVA analysiert und sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	Mittelwert	Wiederholbarkeit		Innerhalb des Standortes		Reproduzierbarkeit	
		SD	VK	SD	VK	SD	VK
QCL	129,4 pg/mL	5,5 pg/mL	4,3 %	6,5 pg/mL	5,1 %	7,5 pg/mL	5,8 %
QCH	411,8 pg/mL	14,5 pg/mL	3,5 %	18,4 pg/mL	4,5 %	19,8 pg/mL	4,8 %
1	65,4 pg/mL	4,4 pg/mL	6,7 %	5,7 pg/mL	8,8 %	10,7 pg/mL	16,4 %
2	189,7 pg/mL	8,5 pg/mL	4,5 %	17,7 pg/mL	9,3 %	33,5 pg/mL	17,7 %
3	228,2 pg/mL	8,8 pg/mL	3,9 %	15,7 pg/mL	6,9 %	30,6 pg/mL	13,4 %
4	390,4 pg/mL	12,1 pg/mL	3,1 %	31,1 pg/mL	8,0 %	38,0 pg/mL	9,7 %
5	655,8 pg/mL	18,7 pg/mL	2,8 %	38,3 pg/mL	5,8 %	63,8 pg/mL	9,7 %
6	883,2 pg/mL	26,4 pg/mL	3,0 %	55,4 pg/mL	6,3 %	128,1 pg/mL	14,5 %

14.5 LINEARITÄT

Die Linearitätsstudie wurde gemäß der CLSI EP06-Ed2-Richtlinie mit vier Humanserumproben durchgeführt, die den Testbereich (zwischen 226 und 2500 pg/mL) abdecken.

Die Proben wurden in Serumproben mit einer niedrigen DHT-Konzentration (weniger als 50 pg/mL) in mehreren äquidistanten Konzentrationsstufen und bis zu zehn Prozent (1:10) verdünnt, in Doppelbestimmung getestet und die Ergebnisse mit der vorhergesagten Konzentration verglichen. Die statistische Analyse zeigt, dass der Assay bis zu einer Verdünnung von 1:10 ausreichend linear ist.



14.6 WIEDERFINDUNG

Es wurden Spiked-Proben hergestellt, indem vier Serumproben definierte Mengen DHT (das in Serumproben mit hoher DHT-Konzentration vorhanden ist) zugesetzt wurden. Die Ergebnisse (in pg/mL) sind im Folgenden tabellarisch dargestellt:

Proben	Konzentration Ergebnis	Konz. der aufgestockten Proben	Erwartete Konzentration aus 9:1 v/v	Wiederfindung
1	**91,3 pg/mL**	-	-	-
	177,3 pg/mL	800 pg/mL	162,2 pg/mL	109,3 %
	230,2 pg/mL	1472 pg/mL	229,4 pg/mL	100,3 %
	313,8 pg/mL	2672 pg/mL	349,4 pg/mL	89,8 %
2	**191,6 pg/mL**	-	-	-
	261,0 pg/mL	800 pg/mL	252,5 pg/mL	103,4 %
	306,2 pg/mL	1472 pg/mL	319,7 pg/mL	95,8 %
	408,0 pg/mL	2672 pg/mL	439,7 pg/mL	92,8 %

Proben	Konzentration Ergebnis	Konz. der aufgestockten Proben	Erwartete Konzentration aus 9:1 v/v	Wiederfindung
3	**379,5 pg/mL**	**-**	**-**	**-**
	433,2 pg/mL	800 pg/mL	421,6 pg/mL	102,7 %
	499,5 pg/mL	1472 pg/mL	488,8 pg/mL	102,2 %
	573,3 pg/mL	2672 pg/mL	608,8 pg/mL	94,2 %
4	**360,2 pg/mL**	**-**	**-**	**-**
	383,2 pg/mL	800 pg/mL	404,2 pg/mL	94,8 %
	461,8 pg/mL	1472 pg/mL	471,4 pg/mL	98,0 %
	510,8 pg/mL	2672 pg/mL	591,4 pg/mL	86,4 %

14.7 METHODENVERGLEICH

Der 5α Dihydrotestosterone (DHT) ELISA (y) wurde mit einer Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-DHT-Methode (x) verglichen.

Der Vergleich von 90 Serumproben ergab die folgenden linearen Regressionsergebnisse unter Verwendung einer Passing-Bablok-Anpassung:

$y = 0{,}78x + 73{,}8$; $r = 0{,}88$

15 NORMWERTE

Die Referenzbereiche (95%) wurden anhand von Proben von erwachsenen Personen unterschiedlicher Herkunft ermittelt. Jedes Labor sollte seinen eigenen Referenzwertbereich festlegen.

Gruppe	n	Median	95% Referenzbereich
Erwachsene Männer (20 – 89 Jahre)	304	380 pg/mL	143 – 842 pg/mL
Erwachsene Frauen (18 – 50 Jahre)	183	91 pg/mL	ND – 596 pg/mL
Erwachsene Frauen (51 – 83 Jahre)	135	53 pg/mL	ND – 431 pg/mL

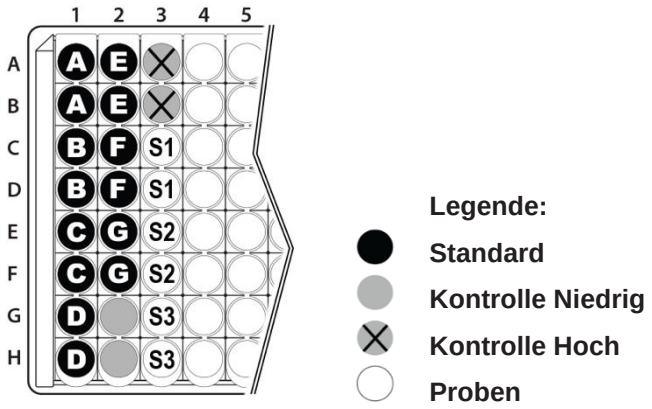
ND = Not detectable = Nicht nachweisbar; niedriger als LoD

Die Referenzbereiche wurden anhand von pädiatrischen Proben wie unten dargestellt bestimmt. Aufgrund des begrenzten Probenumfangs, konnte kein 95%iger Referenzbereich festgelegt werden; es wird der gesamte Bereich angegeben. Jedes Labor muss seinen eigenen Referenzwertbereich festlegen.

Geschlecht	Alter	n	Gesamtbereich
Jungen	1 – 9 Jahre	40	ND – 85.7 pg/mL
	10 – 14 Jahre	26	11.1 – 875.6 pg/mL
	15 – 18 Jahre	14	70.3 – 1260.9 pg/mL
Mädchen	2 – 9 Jahre	40	ND – 88.9 pg/mL
	10 – 14 Jahre	21	22.5 – 280.6 pg/mL
	15 – 18 Jahre	19	62.6 – 760.3 pg/mL

ND = Not detectable = Nicht nachweisbar; niedriger als LoD.

16 EMPFOHLENES ASSAY-LAYOUT



17 LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO / REFERENCIAS

1. Marchetti P, Barth, JH (2013) Clinical Biochemistry of Dihydrotestosterone.
   Annals of Clinical Biochemistry, 50:95-107.
2. Hong H. et al. (2015) Human sex hormone binding globulin binding affinities of 125 structurally diverse chemicals and comparison with their binding to androgen receptor, estrogen receptor and α-fetoprotein.
   Toxicology Science, 143:333-348.
3. Arabnezhad MR et al. (2020), Anti-androgenic effect of 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) in LNCaP cells is mediated by the aryl hydrocarbon-androgen receptors cross-talk,
   Steroids, 153:108508.
4. Litman HJ. (2006) Serum Androgen Levels in Black, Hispanic, and White men.
   The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 91:4326-4334.
5. Bhattacharyya D et al. (2018). Measuring Dihydrotestosterone (DHT) in Blood Serum for Research Purposes using Derivatization and LC-MS/MS. Thermo-Fisher Scientific. Presentation in MSACL - Annual Congress on Mass Spectrometry 2018.
6. Greaves RF, et al. (2017). Harmonization of serum dihydrotestosterone analysis: establishment of an external quality assurance program.
   Clin Chem Lab Med. 55:522-529.
7. Callum Fraser, Biological Variation:
   From Principles to Practice, AACC Press, 2013.
8. Sartorius, G., Spasevska, S., Idan, A., Turner, L., Forbes, E., Zamojska, A., Allan, C.A., Ly, L.P., Conway, A.J., McLachlan, R.I. and Handelsman, D.J. (2012), Serum testosterone, dihydrotestosterone and estradiol concentrations in older men self-reporting very good health: the healthy man study.
   Clin Endocrinol, 77: 755-763. doi:10.1111/j.1365-2265.2012.04432.x
9. E.J. Wickings;,E. Nieschlag (1976) Stability of testosterone and androstenedione in blood and plasma samples.
   Clin Chimica Acta; 71:439-443.
10. Gorityala, S., Yang, S., Montano, M. M., & Xu, Y. (2018). Simultaneous determination of dihydrotestosterone and its metabolites in mouse sera by LC-MS/MS with chemical derivatization.
    Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 1090, 22–35.
    https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.05.008
11. Van der Veen et al. (2019) Development and validation of a LC-MS/MS method for the establishment of reference intervals and biological variation for five plasma steroid hormones.
    Clinical Biochem. 68:15-23.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
CE	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
IVD	*In vitro* diagnostic medical device *	*In-vitro*-Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
REF	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Nûmero de catálogo	Référence de catalogue
LOT	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
Σ	Contains sufficient for < n> tests *	Ausreichend für < n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para < n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks*	Biologische Risiken*	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
Content	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité