

## Instructions for use

# DHT ELISA

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

**REF****AA E-1700****IVD****CE**

**INTENDED USE**

For the direct quantitative determination of Dihydrotestosterone by an enzyme immunoassay in human serum.

**PRINCIPLE OF THE TEST**

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

**CLINICAL APPLICATIONS**

5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) is a steroid similar to testosterone and androstenedione, which belong to a class called androgens. DHT is a C19 steroid and possesses androgenic activity. 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) and albumin. A trace amount of these steroids circulate in the unbound form in the blood and are referred to as the free fractions. DHT has at least three times the binding affinity for SHBG than testosterone. In males about 70% of DHT is derived from peripheral conversion of testosterone, while in females most of the DHT is derived from androstenedione. The major organ to neutralize androgens is the liver. Therefore, in the liver the steroid hormones undergo structural modifications that are generally regarded as prerequisites for their biological inactivation. Some metabolites are formed and some are returned to the circulation before renal excretion. Therefore, elimination of steroids from the body is done through the urine.

Clinical Trends:

- In Klinefelter's syndrome the DHT level is much lower than that found in normal men.
- In idiopathic hirsutism about 40% of the patients have an increased level of DHT.
- In polycystic ovaries (PCO) about 35% of the patients have an increased DHT level.
- The DHT level in young people is much higher than those found in normal older people, hence androgen production increases at puberty which gives rise to masculinizing characteristics. It has been demonstrated that the human testes produce DHT, which appears to originate in the seminiferous tubules. Therefore, in tubular damage the production of DHT is impaired, which causes a decrease in the levels of plasma DHT (patients with germinal cell aplasia and azoospermia).
- There is a very low level of plasma DHT in patients with anorchia.
- It has been reported that in some prostate cancer (especially in stage D) the determination of DHT could be useful in predicting the response to anti-androgen therapy.

**PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS**

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

## LIMITATIONS

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

## SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

### POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

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

### CHEMICAL HAZARDS

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

### SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

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

### SPECIMEN PRETREATMENT

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

### REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED


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

### REAGENTS PROVIDED

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

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

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

Hazards identification: 

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

**4. Standards and Controls**- Ready To Use.

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

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration	Volume/Vial
AA E-1701	STANDARD A	Standard A	0 pg/ml	2.0 ml
AA E-1702	STANDARD B	Standard B	25 pg/ml	0.6 ml
AA E-1703	STANDARD C	Standard C	100 pg/ml	0.6 ml
AA E-1704	STANDARD D	Standard D	500 pg/ml	0.6 ml
AA E-1705	STANDARD E	Standard E	1000 pg/ml	0.6 ml
AA E-1706	STANDARD F	Standard F	2500 pg/ml	0.6 ml
AA E-1751	CONTROL 1	Control 1	Refer to vial labels for expected value and acceptable range!	0.6 ml
AA E-1752	CONTROL 2	Control 2		0.6 ml

Contents: DHT in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of DHT.

Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C

Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label. Once opened, the standards and controls should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

**5. AA E-1713** **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** - Ready To Use.

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

**6. AA E-1731** **96** **Rabbit Anti-DHT Antibody-Coated Break-Apart Well Microplate** - Ready To Use.

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


**7. AA E-1740** **CONJUGATE-CONC 100x** **Dihydrotestosterone-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate** - Requires Preparation X100

Contents: DHT-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.  
 Volume: 200 µl/vial  
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C  
 Stability: 12 months or as indicated on label.  
 Preparation: Dilute 1:100 in assay buffer before use (eg. 20 µl of conjugate concentrate in 2 ml of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 120 µl of HRP in 12 ml of assay buffer. Discard any that is left over.

## ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment: **None**.

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

<b>1.</b>	Prepare <b>working solutions</b> of the <b>DHT-HRP conjugate</b> and <b>wash buffer</b> .
<b>2.</b>	Remove the required number of well strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
<b>3.</b>	<b>Pipette 50 µl</b> of each <b>standard, control and specimen sample</b> into correspondingly labelled wells in duplicate.
<b>4.</b>	Pipette <b>100 µl</b> of the <b>conjugate working solution</b> into each well. <i>(We recommend using a multichannel pipette).</i>
<b>5.</b>	Gently shake the plate for <b>10 seconds</b> and incubate for <b>1 hour</b> at <b>room temperature</b> <i>(no shaking)</i> .
<b>6.</b>	Wash the wells <b>3 times</b> with <b>300 µl</b> of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry <i>(The use of a washer is recommended)</i> .
<b>7.</b>	Pipette <b>150 µl</b> of <b>TMB substrate</b> into each well at timed intervals.
<b>8.</b>	Gently shake the plate for <b>10 seconds</b> and incubate for <b>10 – 15 minutes</b> at <b>room temperature</b> <i>(no shaking)</i> or until Standard A attains dark blue colour for desired OD.
<b>9.</b>	Pipette <b>50 µl</b> of <b>stopping solution</b> into each well at the same timed intervals as in step 7.
<b>10.</b>	Read the plate on a microwell plate reader at <b>450 nm</b> within 20 minutes after addition of the stopping solution.
	<i>If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 405 or 415nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.</i>

## CALCULATIONS

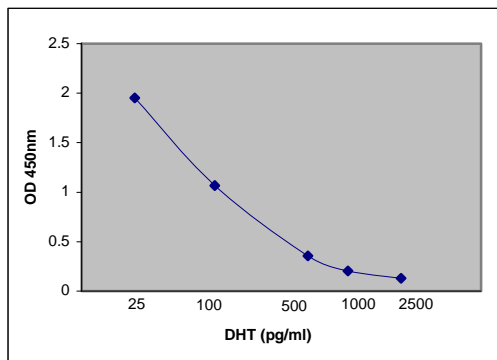
1. Calculate the mean optical density of each standard duplicate.
2. Draw a standard curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the standard concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the standard curve.
5. If a sample reads more than 2500 pg/ml then dilute it with Standard A at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

## TYPICAL TABULATED DATA

Standard	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (pg/ml)
A	2.320	2.279	2.300	0
B	1.976	1.928	1.952	25
C	1.058	1.077	1.068	100
D	0.359	0.354	0.357	500
E	0.222	0.205	0.214	1000
F	0.131	0.128	0.130	2500
Unknown	0.515	0.507	0.511	300

**TYPICAL STANDARD CURVE**

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



**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**SENSITIVITY**

The lower detection limit is calculated from the standard curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Standard A (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the Direct Dihydrotestosterone ELISA kit is **6.0 pg/ml**.

**SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)**

The following compounds were tested for cross-reactivity with the Direct Dihydrotestosterone ELISA kit with dihydrotestosterone cross-reacting at 100%.

Steroid	% Cross Reactivity
Dihydrotestosterone	100
Testosterone	8.7
5β Dihydrotestosterone	2.0
Androstenedione	0.2

The following steroids were tested but cross-reacted at less than 0.01%: Dehydroepiandrosterone Sulfate, 17β-Estradiol, Estriol, Estrone, Progesterone, 17-OH Progesterone, Cortisol, and Pregnenolone.

**INTRA-ASSAY PRECISION**

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

Sample	Mean	SD	CV%
1	236.74	26.89	11.4
2	869.03	47.41	5.46
3	1008.14	39.36	3.90

**INTER-ASSAY PRECISION**

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

Sample	Mean	SD	CV%
1	280.88	34.07	12.1
2	721.40	54.20	7.5
3	1025.41	60.45	5.9

**RECOVERY**

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

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1 Unspiked	290.54	-	-
+117.53	361.51	408.07	88.6
+235.06	501.66	525.60	95.4
+470.13	744.81	760.67	97.9
2 Unspiked	324.75	-	-
+117.53	389.43	442.29	88.0
+235.06	505.23	559.81	90.3
+470.13	712.44	794.88	89.6
3 Unspiked	720.11	-	-
+117.53	758.13	837.64	90.5
+235.06	856.46	955.17	89.7
+470.13	1013.61	1190.24	85.1

**LINEARITY**

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

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1	340.67	-	-
1:2	165.35	170.34	97.1
1:4	95.39	85.17	112.0
1:8	48.47	42.58	113.8
2	1086.01	-	-
1:2	508.58	543.00	93.7
1:4	232.11	271.50	85.5
1:8	114.95	135.75	84.7
3	1313.21	-	-
1:2	612.98	656.61	93.4
1:4	318.63	328.30	97.1
1:8	134.98	164.15	82.2

**COMPARATIVE STUDIES**

The Direct Dihydrotestosterone ELISA kit (Kit A) was compared with a competitors coated tube RIA kit (Kit B). The results (in pg/ml) are tabulated below:

Group	N	Kit A Mean	Kit B Mean
Females	10	95.5	99.0
Males	10	280.0	252.0

**EXPECTED NORMAL VALUES**

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







Group	Range (pg/ml)
Females:	
Pre-menopausal	24-368
Postmenopausal	10-181
Males	250-990

**REFERENCES**

1. Bassett RM. A Simple Chromatographic Method for the Radioimmunoassay of Four Androgenic Steroids. *Med Lab Sci.* 1980; 37(1):31-8.
2. Baxendale PM, et al. Plasma and Salivary Androstenedione and Dihydrotestosterone in Women with Hyperandrogenism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1983; 18(5):447-57.
3. Brooks RV, Androgens. Physiology and Pathology. In: Makin HL J, ed., *Biochemistry of Steroid Hormones*, 2nd ed., Oxford Blackwell Scientific Publications, 1984; 565.
4. Cameron EHD, et al., eds. *Steroid Immunoassay: Proceedings of the Fifth Tenovus Workshop*, Cardiff, April 1974. Cardiff: Alpha Omega Publishing; 1975.
5. Dunn JF, et al. Transport of Steroid Hormones: Binding of 21 Endogenous Steroids to Testosterone-Binding Globulin and Corticosteroid-Binding Globulin in Human Plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981; 53(1):58-68.
6. Hammond GL, et al. The Simultaneous Radioimmunoassay of Seven Steroids in Human Spermatic and Peripheral Venous Blood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977; 45(1):16-24.
7. Ito T, Horton R. Dihydrotestosterone in Human Peripheral Plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1970; 31(4):362-8.
8. Mean F, et al. Study of the Binding of Dihydrotestosterone, Testosterone and Oestradiol with Sex Hormone Binding Globulin. *Clin Chim Acta.* 1977; 80(1):171-80.
9. Mooradian AD, et al. The Biological Actions of Androgens. *Endocr Rev.* 1987; 8(1):1-28.
10. Pazzagli M, et al. Radioimmunoassay of Plasma Dihydrotestosterone in Normal and Hypogonadal Men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1975; 4(5):513-20.
11. Wakelin K, et al. Relationship of 5 $\beta$ dihydrotestosterone and 5 $\alpha$ dihydrotestosterone to testosterone in health and disease. *J Endocrinol.* 1980; 87:450.
12. Wang C, et al. Salivary Androgens in Hirsutism: Are They of Use in Routine Evaluation? *Ann Clin Biochem.* 1986; 23(Pt 5):590-5.
13. Kricka LJ. Human Anti-Animal Antibody Interferences in Immunological Assays. *Clin Chem.* 1999; 45(7):942-56.
14. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. *Gynecol Obstet Invest.* 1995; 40(2):139-40.

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

**Symbols:**

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



**VERWENDUNGSZWECK**

Für die direkte quantitative Bestimmung von Dihydrotestosterone in menschlichem Serum durch Enzymimmunoassay. Nur zu *in-vitro*-Diagnosezwecken.

**TESTPRINZIP**

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

**KLINISCHE ANWENDUNGEN**

5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) ist ein ähnliches Steroid wie Testosteron und Androstendion und gehört zur Klasse der sogenannten Androgene.

DHT ist ein C19 Steroid und besitzt androgene Aktivität. Der größte Teil der androgenen Produktion findet hauptsächlich in den Leydigzellen der Hoden statt.

An Proteine gebundene Androgene zirkulieren im Blut, vor allem Sexualhormon-bindendes Globulin (SHBG), sowie Albumin.

DHT hat eine mindestens dreimal höhere Bindungsaffinität zu SHBG als Testosteron. Bei Männern stammt ca. 70% des DHT aus der peripheren Umsetzung von Testosteron, wohingegen bei Frauen der Großteil des DHT aus dem Androstendion stammt.

Das Hauptorgan zur Neutralisierung von Androgenen ist die Leber. Aus diesem Grund werden die Steroidhormone in der Leber in ihrer Struktur modifiziert. Dies wird als generelle Voraussetzung für ihre biologische Inaktivierung angesehen. Manche Metaboliten werden modifiziert, andere kehren zunächst zurück in den Blutkreislauf, bevor sie ausgeschieden werden. Die Entfernung der Steroide aus dem Körper erfolgt somit durch die Ausscheidung über den Urin.

Klinische Trends:

- Patienten mit Klinefelter-Syndrom weisen deutlich niedrigere DHT Konzentrationen auf als Gesunde.
- Ungefähr 40% aller von Hirsutismus betroffenen Patienten haben einen erhöhten DHT-Spiegel.
- Ungefähr 35% aller Patienten mit Polyzystischen Ovarialsyndrom (PCO) haben einen erhöhten DHT-Spiegel.
- Der DHT-Spiegel junger Menschen ist deutlich höher als der von gesunden, älteren Menschen. Die Androgenproduktion nimmt somit in der Pubertät zu und hat die Ausprägung maskuliner Merkmale zur Folge. Es ist erwiesen, dass die menschlichen Hoden in den Hodenkanälchen DHT produzieren. Die Produktion von DHT wird daher im Fall von Verletzungen an den Hodenkanälchen mitbeeinträchtigt, was zu niedrigeren Plasma-DHT-Spiegeln führt (Patienten mit Keimzellaplasie und Azoospermie).
- Patienten mit Anorchie weisen ebenfalls sehr niedrige Plasma-DHT-Spiegel auf.
- Des Weiteren wurde berichtet, dass bei manchen Formen von Prostata-Krebs (besonders im Stadium D) die Bestimmung von DHT hilfreich sein kann, um die Reaktion auf die Anti-Androgen-Therapie vorherzusagen.

**VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE**

1. Anwender sollten für den erfolgreichen Einsatz dieses Kits das Protokoll gründlich verstanden haben. Zuverlässige Leistung wird nur durch strenge und sorgfältige Einhaltung der Anleitung erreicht.
2. Kontrollmaterialien oder Serumpools sollten mit hoher und niedriger Konzentration in jeden Lauf zur Beurteilung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse einbezogen werden.
3. Wenn Wasser zur Verdünnung oder Rekonstitution zu verwenden ist, ist demineralisiertes oder destilliertes Wasser einzusetzen.
4. Um Kontakt mit potenziell schädlichen Substanzen zu reduzieren, sollten bei der Handhabung der Testreagenzien und Humanproben Handschuhe getragen werden.
5. Alle Reagenzien und Proben sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich durchmischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben.
6. Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
7. Die Kontrollen sollten in jeden Lauf eingeschlossen werden und innerhalb etablierter Vertrauensgrenzen liegen.
8. Unsachgemäße Verfahrenstechniken, unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen und unsachgemäße Lagerung der Reagenzien können in Frage kommen, wenn die Messwerte für die Kontrollen nicht in den etablierten Bereichen liegen.
9. Beim Lesen der Mikrotiterplatte beeinflussen Blasen in den Wells die Extinktionswerte (ODs). Entfernen Sie vor dem Messschritt jegliche Blasen sorgfältig.

10. Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte bei richtiger Lagerung farblos bleiben. Instabilität und Verunreinigung können an der Entstehung einer blauen Farbe erkannt werden, in welchem Fall die Lösung nicht verwendet werden sollte.
11. Beim Dosieren von Substrat und Stopplösung verwenden Sie keine Pipetten, in denen diese Flüssigkeiten in Kontakt mit Metallteilen kommen.
12. Um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, verwenden Sie zur Entnahme aller Reagenzien, Proben, Standards und Kontrollen jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze.
13. Verschiedene Chargen von Kit-Komponenten sind innerhalb eines Tests nicht zu mischen, und keine Komponente darf nach dem Verfallsdatum auf dem Etikett verwendet werden.
14. Kit-Reagenzien müssen gemäß nationalen Vorschriften als gefährlicher Abfall entsorgt werden.

#### **EINSCHRÄNKUNGEN**

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

#### **VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL**

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

#### **CHEMISCHE GEFAHREN**

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

#### **PROBENNAHME UND -LAGERUNG**

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

#### **PROBENVORBEHANDLUNG**

Dieser Assay ist ein Direktsystem; keine Probenvorbehandlung ist notwendig.


#### **BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERT REAGENZIEN UND INSTRUMENTE**

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

**MITGELIEFERTE REAGENZIEN**

**1. AA E-0030**     **WASH-CONC 10x**     **Waschpufferkonzentrat** - erfordert eine Vorbereitung X10  
 Inhalt:            Eine Flasche Puffer mit nichtionischem Detergens und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.  
 Volumen:         50 ml/Flasche  
 Lagerung:         Gekühlt bei 2-8 °C  
 Stabilität:        12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.  
 Vorbereitung:    Vor der Verwendung 1:10 in destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 50 ml Waschpufferkonzentrat mit 450 ml Wasser verdünnen.

**2. AA E-0055**     **SUBSTRATE**            **TMB Substrat** – Gebrauchsfertig.  
 Inhalt:            Eine Flasche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem DMF- und DMSO-freien Puffer.  
 Volumen:         6 ml/Flasche  
 Lagerung:         Gekühlt bei 2-8 °C  
 Stabilität:        12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

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

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

**4. Standards und Kontrollen** – Gebrauchsfertig.

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

Kat.-Nr.	Zeichen	Standard	Konzentration	Volumen/Fläschchen
AA E-1701	STANDARD A	Standard A	0 pg/ml	2.0 ml
AA E-1702	STANDARD B	Standard B	25 pg/ml	0.6 ml
AA E-1703	STANDARD C	Standard C	100 pg/ml	0.6 ml
AA E-1704	STANDARD D	Standard D	500 pg/ml	0.6 ml
AA E-1705	STANDARD E	Standard E	1000 pg/ml	0.6 ml
AA E-1706	STANDARD F	Standard F	2500 pg/ml	0.6 ml
AA E-1751	CONTROL 1	Kontrolle 1	Siehe Fläschchenetiketten für Erwartungswert und akzeptablen Bereich!	0.6 ml
AA E-1752	CONTROL 2	Kontrolle 2		0.6 ml


Inhalt:            DHT in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel. Hergestellt durch Dotieren von Puffer mit einer definierten Menge von DHT.  
 Lagerung:         Gekühlt bei 2-8 °C  
 Stabilität:        12 Monate im ungeöffneten Fläschchen oder wie auf dem Etikett angegeben. Einmal geöffnet, sollten die Standards und Kontrollen innerhalb von 14 Tagen verwendet oder aliquotiert und eingefroren gelagert werden. Mehrfache Einfrier- und Auftauzyklen sind zu vermeiden.

- 5. AA E-1713** ASSAY-BUFF **Assay-Puffer** – Gebrauchsfertig.
- Inhalt: Ein Fläschchen mit proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
- Volumen: 15 ml/Flasche
- Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
- Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
- 6. AA E-1731** 96 **Mikrotiterplatte mit Anti-DHT-Kaninchenantikörper beschichtet - herausbrechbare Wells** - gebrauchsfertig.
- Inhalt: Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (12×8), mit polyklonalem Antikörper beschichtet, in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.
- Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
- Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
- 7. AA E-1740** CONJUGATE-CONC 100x **Dihydrotestosteron –Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat-Konzentrat** – erfordert eine Vorbereitung X100
- Inhalt: DHT-HRP-Konjugat in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
- Volumen: 0,2 ml/Fläschchen
- Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
- Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
- Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:100 mit Assay-Puffer verdünnen (z. B. 20 µl HRP mit 2 ml Assay-Puffer). Wenn die ganze Platte verwendet werden soll, 120 µl HRP mit 12 ml Assay-Puffer verdünnen. Was übrigbleibt, ist zu entsorgen.

#### TESTVERFAHREN

##### Probenvorbereitung: keine

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

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

### BERECHNUNGEN

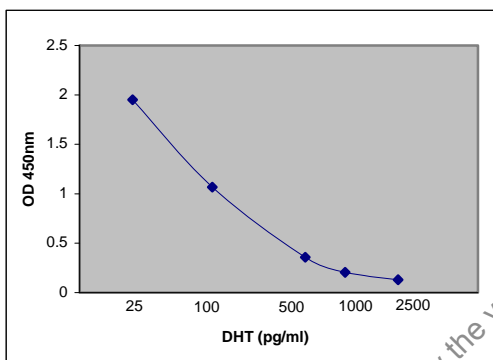
1. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standard-Duplikats.
2. Zeichnen Sie auf halblogarithmischem Papier eine Standardkurve mit mittlerer optischer Dichten als Y-Achse und Standardkonzentration als X-Achse. Wenn Immunoassay-Software verwendet wird, wird eine 4- oder 5-Parameter-Kurve empfohlen.
3. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes unbekanntes Duplikats.
4. Lesen Sie die unbekanntes Werte direkt von der Standardkurve ab.
5. Wenn eine Probe mit mehr als 2500 pg/ml gemessen wird, verdünnen Sie sie mit Standard A auf eine Verdünnung von nicht mehr als 1:8. Das erhaltene Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

### TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Standard	OD 1	OD 2	MW OD	Wert (pg/ml)
A	2,320	2,279	2,300	0
B	1,976	1,928	1,952	25
C	1,058	1,077	1,068	100
D	0,359	0,354	0,357	500
E	0,222	0,205	0,214	1000
F	0,131	0,128	0,130	2500
Unbekannt	0,515	0,507	0,511	300

### TYPISCHE STANDARDKURVE

Beispielkurve. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.



### LEISTUNGSMERKMALE

#### EMPFINDLICHKEIT

Die untere Nachweisgrenze ergibt sich aus der Standardkurve durch die Bestimmung der resultierenden Konzentration der mittleren OD der Standard A (basierend auf 10 Analysen) minus  $2\sigma$ . Daher beträgt die Empfindlichkeit des "DHT ELISA Kit" **6.0 pg/ml**.

**SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)**

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

Steroid	% Kreuzreaktion
Dihydrotestosteron	100
Testosteron	8,7
5β Dihydrotestosteron	2,0
Androstenedion	0,2

Die folgenden Steroide wurden getestet, aber zeigten weniger als 0,01% Kreuzreaktivität: Dehydroepiandrosteron-Sulfat, 17β-Östradiol, Östriol, Östron, Progesteron, 17-OH Progesteron, Cortisol und Prgnenolon.

**REPRODUZIERBARKEIT INNERHALB EINES ASSAYS**

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

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	236,74	26,89	11,4
2	869,03	47,41	5,46
3	1008,14	39,36	3,90

**REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN ASSAYS**

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

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	280,88	34,07	12,1
2	721,40	54,20	7,5
3	1025,41	60,45	5,9

**WIEDERFINDUNG**

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

Probe	Beob. Resultat	Erw. Resultat	Wiederfindung (%)
1 Undotiert	290,54	-	-
+117.53	361,51	408,07	88,6
+235.06	501,66	525,60	95,4
+470.13	744,81	760,67	97,9
2 Undotiert	324,75	-	-
+117.53	389,43	442,29	88,0
+235.06	505,23	559,81	90,3
+470.13	712,44	794,88	89,6
3 Undotiert	720,11	-	-
+117.53	758,13	837,64	90,5
+235.06	856,46	955,17	89,7
+470.13	1013,61	1190,24	85,1

### LINEARITÄT

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

Probe	Beob. Resultat	Erw. Resultat	Wiederfindung (%)
1	340,67	-	-
1:2	165,35	170,34	97,1
1:4	95,39	85,17	112,0
1:8	48,47	42,58	113,8
2	1086,01	-	-
1:2	508,58	543,00	93,7
1:4	232,11	271,50	85,5
1:8	114,95	135,75	84,7
3	1313,21	-	-
1:2	612,98	656,61	93,4
1:4	318,63	328,30	97,1
1:8	134,98	164,15	82,2

### VERGLEICHSTUDIEN

Das "Dihydrotestosteron ELISA Kit" (Kit A) wurde mit einem auf beschichteten Röhrchen basierenden RIA-Kit (Kit B) verglichen. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind nachfolgend tabellarisch dargestellt:

Gruppe	N	Kit A MW	Kit B MW
Frauen	10	95,5	99,0
Männer	10	280,0	252,0

### ERWARTETE WERTE

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







Gruppe	Bereich (pg/ml)
Frauen:	
Prämenopausal	24-368
Postmenopausal	10-181
Männer	250-990

### LITERATUR

1. Bassett RM. A Simple Chromatographic Method for the Radioimmunoassay of Four Androgenic Steroids. *Med Lab Sci.* 1980; 37(1):31-8.
2. Baxendale PM, et al. Plasma and Salivary Androstenedione and Dihydrotestosterone in Women with Hyperandrogenism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1983; 18(5):447-57.
3. Brooks RV, Androgens. Physiology and Pathology. In: Makin HL J, ed., *Biochemistry of Steroid Hormones*, 2nd ed., Oxford Blackwell Scientific Publications, 1984; 565.
4. Cameron EHD, et al., eds. *Steroid Immunoassay: Proceedings of the Fifth Tenovus Workshop*, Cardiff, April 1974. Cardiff: Alpha Omega Publishing; 1975.
5. Dunn JF, et al. Transport of Steroid Hormones: Binding of 21 Endogenous Steroids to Testosterone-Binding Globulin and Corticosteroid-Binding Globulin in Human Plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981; 53(1):58-68.
6. Hammond GL, et al. The Simultaneous Radioimmunoassay of Seven Steroids in Human Spermatic and Peripheral Venous Blood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977; 45(1):16-24.
7. Ito T, Horton R. Dihydrotestosterone in Human Peripheral Plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1970; 31(4):362-8.
8. Mean F, et al. Study of the Binding of Dihydrotestosterone, Testosterone and Oestradiol with Sex Hormone Binding Globulin. *Clin Chim Acta.* 1977; 80(1):171-80.
9. Mooradian AD, et al. The Biological Actions of Androgens. *Endocr Rev.* 1987; 8(1):1-28.
10. Pazzagli M, et al. Radioimmunoassay of Plasma Dihydrotestosterone in Normal and Hypogonadal Men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1975; 4(5):513-20.
11. Wakelin K, et al. Relationship of 5 $\beta$ dihydrotestosterone and 5 $\alpha$ dihydrotestosterone to testosterone in health and disease. *J Endocrinol.* 1980; 87:450.
12. Wang C, et al. Salivary Androgens in Hirsutism: Are They of Use in Routine Evaluation? *Ann Clin Biochem.* 1986; 23(Pt 5):590-5.
13. Kricka LJ. Human Anti-Animal Antibody Interferences in Immunological Assays. *Clin Chem.* 1999; 45(7):942-56.
14. Check JH, et al. Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. *Gynecol Obstet Invest.* 1995; 40(2):139-40.

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

**Symbole:**

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	<b>LOT</b>	Chargennummer	<b>IVD</b>	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	<b>CONT</b>	Inhalt	<b>CE</b>	CE gekennzeichnet
	Achtung	<b>REF</b>	Katalog-Nummer		