LDN®
IMMUNOASSAYS AND SERVICES
BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY
LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

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

Instructions for use

DHT ELISA

REF **AA E-1900**

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 DHT ELISA is a competitive immunoassay. Competition occurs between DHT present in standards, 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 standards is used to plot a standard 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 standard 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.

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

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, standard, 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.

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

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 standards 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 – 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

1. AA E-1931 96 **Microplate** – Ready to Use

Contents: One anti-DHT polyclonal antibody-coated 96-well (12x8) microplate in a resealable pouch with desiccant.

Storage: 2 – 8 °C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for four weeks.

2. AA E-1940 CONJUGATE **HRP Conjugate** – Ready to Use

Contents: One bottle containing DHT-Horse Radish Peroxidase (HRP) conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 15 ml/bottle

Storage: 2 – 8 °C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for four weeks.

3. 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/bottle
AA E-1901	STANDARD A	**Standard A**	0 pg/ml	1.0 ml
AA E-1902	STANDARD B	**Standard B**	25 pg/ml	1.0 ml
AA E-1903	STANDARD C	**Standard C**	100 pg/ml	1.0 ml
AA E-1904	STANDARD D	**Standard D**	250 pg/ml	1.0 ml
AA E-1905	STANDARD E	**Standard E**	500 pg/ml	1.0 ml
AA E-1906	STANDARD F	**Standard F**	1000 pg/ml	1.0 ml
AA E-1907	STANDARD G	**Standard G**	2500 pg/ml	1.0 ml
AA E-1951	CONTROL 1	**Control 1**	Refer to the QC certificate for the target values and acceptable ranges.	1.0 ml
AA E-1952	CONTROL 2	**Control 2**		1.0 ml

Contents: Seven bottles of standard containing specified DHT concentrations. Human serum-based matrix with a non-mercury preservative. Prepared by spiking matrix with defined quantities of DHT.
Two bottles of control containing different DHT concentrations. Human serum-based matrix with a non-mercury preservative. Prepared by spiking matrix with defined quantities of DHT.

Storage: 2 – 8 °C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for four weeks.

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

4. 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: 2 – 8 °C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for four weeks.

5. AA E-1980 STOP-SOLN **Stopping Solution** – Ready to Use

Contents: One bottle containing 1 M sulfuric acid.

Volume: 8 ml/bottle

Storage: 2 – 8 °C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for four weeks.

Hazards identification:

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

6. AA E-0030 WASH-CONC 10x **Wash Buffer Concentrate** – Concentrated; Requires Preparation

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.

Volume: 50 ml/bottle

Storage: 2 – 8 °C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for four weeks.

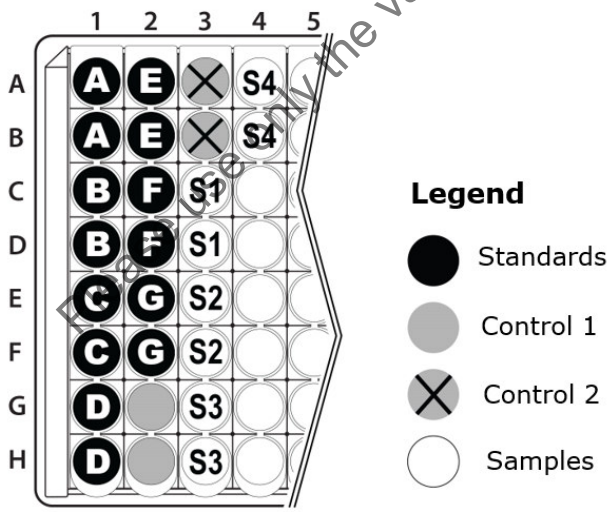
Following Preparation: The wash buffer working solution is stable for 2 weeks following preparation, assuming Good Laboratory Practices are adhered to. To prevent microbial growth, prepare the wash buffer working solution in a clean container and store under refrigerated conditions (2 – 8 °C) when not in use.

Preparation of Wash Buffer Working Solution: **X10** **Dilute 1:10 Before Use**

Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole microplate is to be used dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of distilled or deionized water.

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

10. RECOMMENDED ASSAY LAYOUT



11. ASSAY PROCEDURE

Specimen Pre-Treatment: None

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

1.	After all kit components have reached room temperature, **mix** gently by inversion.
2.	**Prepare** the Wash Buffer Working Solution (See section *9. Reagents Provided, 7. Wash Buffer Concentrate*).
3.	**Plan** the microplate wells to be used for standards, controls, and samples. See section *10. Recommended Assay Layout.* Remove the strips from the microplate frame that will not be used 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 standard, control, and specimen sample into assigned wells.
5.	**Pipette 100 µl** of the HRP 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 microplate wells 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 Stopping 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. 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 Stopping Solution.

12. CALCULATIONS

1. Calculate the mean optical density for each standard, control and specimen sample duplicate.
2. Use a 4-parameter or 5-parameter curve fit with immunoassay software to generate a standard curve.
3. The immunoassay software will calculate the concentrations of the controls and specimen samples using the mean optical density values and the standard 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.

13. QUALITY CONTROL

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

1. The Standard A mean optical density meets the acceptable range as stated in the QC Certificate.
2. The standard with the highest concentration meets the % binding acceptable range as stated in the QC Certificate. % Binding = (OD of Standard/OD of Standard 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.

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

14. TYPICAL DATA

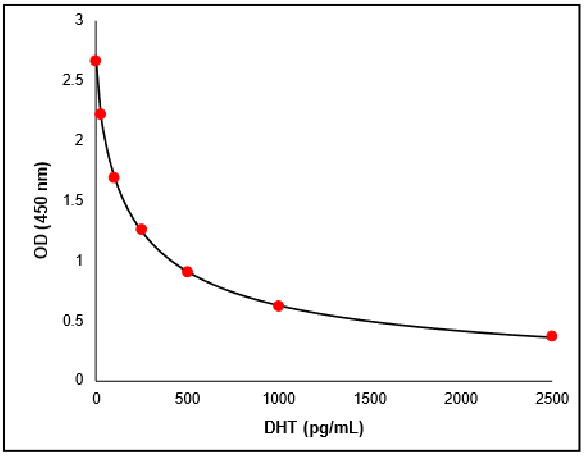
14.1 TYPICAL TABULATED DATA

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

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

14.2 TYPICAL STANDARD CURVE

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



15. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

15.1 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.

15.2 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

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

15.3 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.

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

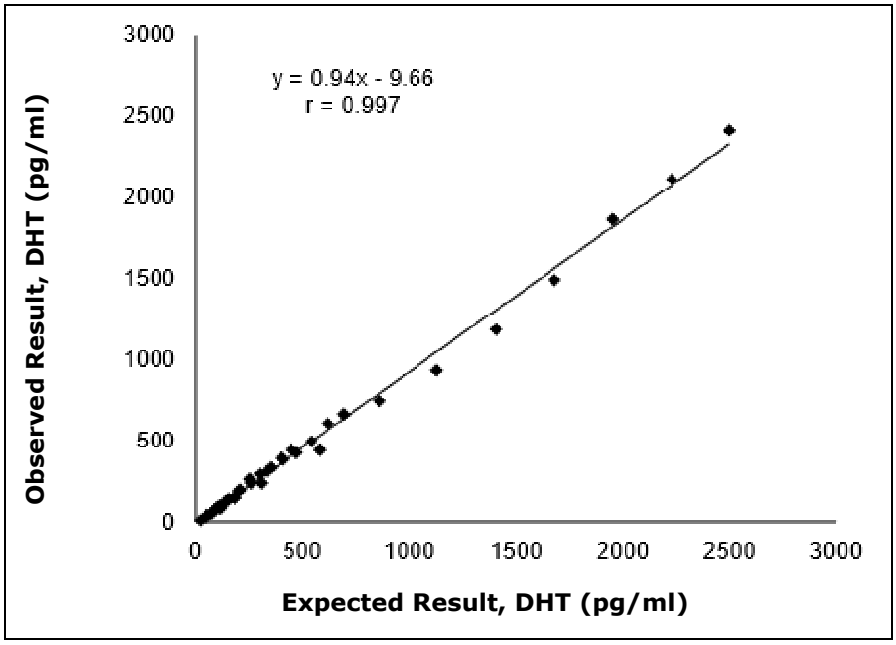
Reproducibility
The reproducibility study evaluated the precision performance of the device following experimental design model 3 x 5 x 5 (3 locations x five testing days x five replicates per day) across laboratories located in Italy, the USA and Canada. The results were analyzed with a two-way nested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

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

15.5 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.

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



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

15.7 COMPARATIVE STUDIES

The DHT ELISA kit (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: $y = 0.78x + 73.8$, $r = 0.88$.

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

16. REFERENCE RANGES

Reference ranges (95%) were estimated using samples obtained from adult individuals of diverse races. Each laboratory shall establish their own range of reference values. ND = Not detectable; lower than the LoD.

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

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 (Years)	N	Total Range (pg/ml)
Male	1 – 9	40	ND – 85.7
	10 – 14	26	11.1 – 875.6
	15 – 18	14	70.3 – 1260.9
Female	2 – 9	40	ND – 88.9
	10 – 14	21	22.5 – 280.6
	15 – 18	19	62.6 – 760.3

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

17. LITERATURE

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.

18. CHANGE HISTORY

Previous Version:	2.0	**New Version:**	3.0
Changes:	New IFU format with numbered headings. **1. INTENDED PURPOSE & USE** Addition: 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 and 2 added. **5. PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS** Additional cautions and warnings added. Some previous limitations added to this section. **8. REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED** Addition of Automatic microplate washer. **11. ASSAY PROCEDURE** Component names revised to match symbol definitions. **13. QUALITY CONTROL** New section added. **15.4 PRECISION** **Reproducibility** New section/data added. **18. CHANGE HISTORY** New section added. Addition of product complaints, warranty and limitation of liability sections.		

Product Complaints
In the case of product complaints, the user shall submit in writing to the distributor or manufacturer a description of the complaint and provide accompanying data and/or information.

Warranty
The manufacturer guarantees that the product is free of defects and will perform within the product specifications when the product is used prior to the expiration date, according to the intended purpose and use, and according to the instructions for use provided with the product. Any deviations from the intended purpose and use, instructions for use, modifications to kit components or use beyond the expiration date will invalidate any warranty claims.

Limitation of Liability
The manufacturer liability in all circumstances whether in tort (including negligence) or at common law, and for any damage or loss, including but not limited to loss of profit and loss of sales, suffered whether direct, indirect, consequential, incidental or special is limited to the purchase price of the product(s) in question.

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

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date	LOT	Batch code	IVD	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE marking of conformity
	Caution	REF	Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

1. VERWENDUNGSZWECK

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

Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch und den Laborgebrauch bestimmt. 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 VERWENDUNGSZWECK

1. Dieser Test ist nicht für Screeningzwecke bestimmt.
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 bewertet wurden, können andere Substanzen, die nicht evaluiert wurden, wie z.B. Medikamente und das Auftreten heterophiler Antikörper 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 an Proteine gebunden im Blut, insbesondere an Sexualhormonbindendes 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 Hodengewebe[1].

4. TESTPRINZIP

Der DHT ELISA ist ein kompetitiver Immunoassay. Das in den Standards, Kontrollen und Proben vorhandene DHT konkurriert mit einem enzymmarkierten Antigen (HRP Konjugat) um eine begrenzte Anzahl von Anti-DHT-Antikörper-Bindungsstellen in den Wells der Mikrotiterplatte. Nach einem Waschschritt, bei dem ungebundenes Material entfernt wird, 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 mit einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 450 nm gemessen. Mit einem mitgelieferten Satz von Standards wird eine Standardkurve erstellt, aus der die DHT-Menge in den Proben und Kontrollen direkt abgelesen werden kann.

5. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Dieses Kit 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 Kits ist die gute Laborpraxis anzuwenden. Dies beinhaltet:
   - Nicht mit dem Mund pipettieren.
   - In Bereichen, in denen mit Proben oder Kit-Reagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, trinken oder essen.
   - Schutzkleidung und Einweghandschuhe tragen.
   - Nach der Durchführung des Tests gründlich die Hände waschen.
   - Kontakt mit den Augen vermeiden; Schutzbrille tragen; bei Augenkontakt die Augen sofort mit Wasser ausspülen und einen Arzt aufsuchen.
3. Für die erfolgreiche Verwendung dieses Kits sollten die Benutzer dieses Protokoll genau verstehen. Zuverlässige Ergebnisse werden nur bei strikter und sorgfältiger Befolgung der Anweisungen erzielt.
4. Verwenden Sie das Kit nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfalldatums.
5. Wenn die Reagenzien des Kits sichtbar beschädigt sind, darf das Testkit nicht verwendet werden.
6. Keine Kitkomponenten aus verschiedenen Kitchargen innerhalb eines Tests verwenden und keine Komponente nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfalldatums verwenden.
7. Alle Reagenzien und Proben des Kits müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.

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

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 muss jede einzelne Kitkomponente wieder bei der auf dem Etikett angegebenen empfohlenen Lagertemperatur gelagert werden.
10. Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
11. Es wird allen Kunden empfohlen, ihre eigenen Kontrollmaterialien oder Serumpools herzustellen, die bei jedem Lauf in einer hohen und einer niedrigen Konzentration mitgeführt werden sollten, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu beurteilen.
12. Die Kontrollen (im Kit enthalten) müssen bei jedem Lauf mitgeführt werden, und ihre Ergebnisse müssen innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen; ein fehlerhaftes Kontrollergebnis könnte auf unsachgemäße Verfahrenstechniken oder Pipettierung, unvollständiges Waschen oder unsachgemäße Reagenzienlagerung hinweisen.
13. Beim Dosieren der Substrat- und Stopplösungen dürfen keine Pipetten verwendet werden, in denen diese Flüssigkeiten mit Metallteilen in Berührung kommen.
14. Das TMB-Substrat ist lichtempfindlich und sollte bei ordnungsgemäßer Lagerung farblos bleiben. Eine Instabilität oder Kontamination kann durch die Entwicklung einer Blaufärbung angezeigt werden; in diesem Fall sollte es nicht verwendet werden.
15. Kein stark hämolytisches, stark lipämisches, ikterisches oder unsachgemäß gelagertes Serum verwenden.
16. Proben oder Kontrollen, die Azid oder Thimerosal enthalten, sind mit diesem Testkit nicht 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 bekannten 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 Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, ist für jedes Reagenz, jede Probe, jeden Standard und jede Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
20. Um eine Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, die Reagenzien nicht in die Originalbehälter zurückfüllen.
21. Die Reagenzien des Kits sind als Sondermüll zu betrachten und gemäß den örtlichen und/oder nationalen Vorschriften zu entsorgen.
22. Mit dem Kit verwendete Verbrauchsmaterialien, die potenziell biologisch gefährlich sind (z.B. Pipettenspitzen, Flaschen oder Behälter, die menschliches 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. Dieses Kit enthält 1 M Schwefelsäure in der Stopplösungskomponente. Die Säure darf nicht zusammen mit Abfallmaterial entsorgt werden, das Natriumazid oder Natriumhypochlorit enthält.
24. Es wird dringend empfohlen, beim Umgang mit biologisch gefährlichen oder biokontaminierten Lösungen eine Schutzbrille und Einwegplastik zu verwenden.
25. Eine ordnungsgemäße Kalibrierung der für den Test verwendeten Geräte, wie z.B. der Pipetten und des Absorptionsmikrotiterplattenlesegeräts, ist erforderlich.
26. Wenn für das Testverfahren ein Mikrotiterplattenschüttler erforderlich ist, sind Art und Geschwindigkeit des Schüttlers im Abschnitt BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE angegeben. Sowohl die Art als auch die Geschwindigkeit des verwendeten Schüttlers können die optischen Dichten und die Testergebnisse beeinflussen. Wird ein anderer Schüttlertyp und/oder eine andere Schüttelgeschwindigkeit verwendet, so ist der Benutzer dafür verantwortlich, die Leistung des Kits zu überprüfen.
27. Die Wells der Mikrotiterplatten dürfen nicht wiederverwendet werden, sie sind nur für den EINMALIGEN GEBRAUCH bestimmt.
28. Um Kondensation in den Wells der Mikrotiterplatte in feuchten Umgebungen zu vermeiden, den Beutel mit der Mikrotiterplatte erst öffnen, wenn sie Raumtemperatur erreicht hat.
29. Beim Messen der Mikrotiterplatte können Blasen in den Wells die optische Dichte (OD) beeinträchtigen. Entfernen Sie vor dem Messen vorsichtig alle Blasen.
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.

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

6. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

6.1 BIOLOGISCHE GEFÄHRDUNG

Die Reagenzien sind als potenzielle biologische Gefahr zu betrachten und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie Blutproben zu behandeln. Alle menschlichen Proben sind als potenzielle biologische Gefahr zu betrachten und so zu handhaben, als ob sie Infektionen übertragen könnten, wobei die gute Laborpraxis zu beachten ist.

Die mit dem Kit gelieferten Standards und Kontrollen enthalten aufbereitetes Humanserum/-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 biologische Gefahr zu betrachten und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln, wie sie für jede Blutprobe gelten, wobei die gute Laborpraxis zu beachten ist.

6.2 CHEMISCHE GEFAHREN

Den direkten Kontakt mit allen Reagenzien des Kits vermeiden. Insbesondere den Kontakt mit dem TMB-Substrat (enthält Tetramethylbenzidin) und der Stopplösung (enthält Schwefelsäure) vermeiden. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien mit viel Wasser abwaschen und für weitere Informationen das SDS beachten.

7. PROBENENTNAHME, -LAGERUNG UND -VORBEHANDLUNG

7.1 Entnahme und Lagerung von Proben

Für eine Doppelbestimmung werden ca. 0,1 ml Serum benötigt. 4 – 5 ml venöses Blut in ein entsprechend beschriftetes Röhrchen geben und gerinnen lassen. Zentrifugieren Sie bei Raumtemperatur und füllen Sie das Serum vorsichtig in ein neues Röhrchen oder Behältnis um. Serumproben können bis zu sieben Tage bei Raumtemperatur, bis zu vierzehn Tage bei 2 – 8 °C gelagert oder bis zu einem Monat bei -20 °C oder darunter eingefroren werden.
Betrachten Sie alle menschlichen Proben als mögliche biologisch gefährliche Materialien und treffen Sie beim Umgang mit ihnen entsprechende Vorsichtsmaßnahmen.

7.2 Probenvorbehandlung

Es ist keine Probenvorbehandlung notwendig.

8. BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE

1. Kalibrierte Einkanalpipette zur Abgabe von 50 µl.
2. Kalibrierte Mehrkanalpipetten für die Abgabe von 50 µl, 100 µl und 150 µl.
3. Kalibrierte Mehrkanalpipetten zur Abgabe von 350 µl (bei manuellem Waschen).
4. Automatisches Mikrotiterplattenwaschgerät (empfohlen).
5. Einwegpipettenspitzen.
6. Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
7. Kalibriertes Absorptions-Mikrotiterplattenlesegerät mit einem 450-nm-Filter und einer oberen OD-Grenze von 3,0 oder mehr.

9. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

1. AA E-1931 MTP 96 **Microplate** (Mikrotiterplatte) – Gebrauchsfertig

Inhalt: Eine 96-Well-Mikrotiterplatte (12×8), mit polyklonalem Antikörper beschichtet, in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.

Lagerung: 2 – 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen lang haltbar.

2. AA E-1940 CONJUGATE **HRP Conjugate** (HRP Konjugat) – Gebrauchsfertig

Inhalt: Eine Flasche mit DHT-Pferderettichperoxidase (HRP)-Konjugat in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 15 ml/Fläschchen

Lagerung: 2 – 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen lang haltbar.

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

3. Standards und **Kontrollen** – Gebrauchsfertig

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

Kat.-Nr.	Symbol	Standard	Konzentration	Volumen/Fläschchen
AA E-1901	STANDARD A	**Standard A**	0 pg/ml	1,0 ml
AA E-1902	STANDARD B	**Standard B**	25 pg/ml	1,0 ml
AA E-1903	STANDARD C	**Standard C**	100 pg/ml	1,0 ml
AA E-1904	STANDARD D	**Standard D**	250 pg/ml	1,0 ml
AA E-1905	STANDARD E	**Standard E**	500 pg/ml	1,0 ml
AA E-1906	STANDARD F	**Standard F**	1000 pg/ml	1,0 ml
AA E-1907	STANDARD G	**Standard G**	2500 pg/ml	1,0 ml
AA E-1951	CONTROL 1	**Kontrolle 1**	Die Erwartungswerte und akzeptablen Bereiche sind dem QC-Zertifikat zu entnehmen.	1,0 ml
AA E-1952	CONTROL 2	**Kontrolle 2**		1,0 ml

Inhalt: Sieben Flaschen mit Standardlösungen, die bestimmte DHT-Konzentrationen enthalten. Matrix auf Humanserumbasis mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel. Hergestellt durch Aufstockung der Matrix mit einer bestimmten Menge DHT.
Zwei Flaschen mit Kontrollen, die unterschiedliche DHT-Konzentrationen enthalten. Matrix auf Humanserumbasis mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel. Hergestellt durch Aufstockung der Matrix mit einer bestimmten Menge DHT.

Lagerung: 2 – 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen lang haltbar.

4. AA E-0055 SUBSTRATE **TMB Substrate** (TMB-Substrat) – Gebrauchsfertig

Inhalt: Eine Flasche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem DMF- und DMSO-freien Puffer.

Volumen: 16 ml/Fläschchen

Lagerung: 2 – 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen lang haltbar.

5. AA E-1980 STOP-SOLN **Stopping Solution** (Stopplösung) – Gebrauchsfertig

Inhalt: Ein Fläschchen mit 1 M Schwefelsäure.

Volumen: 8 ml/Fläschchen

Lagerung: 2 – 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen lang haltbar.

Mögliche Gefahren:

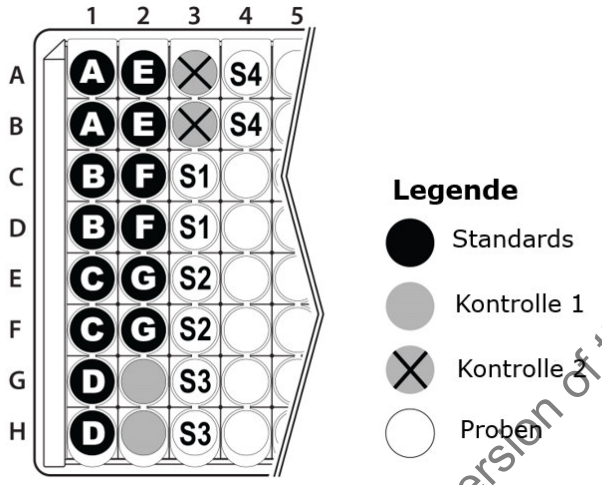
H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

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

6. AA E-0030 WASH-CONC 10x **Wash Buffer Concentrate** (Waschpufferkonzentrat) – Konzentriert; Erfordert Vorbereitung

Inhalt:	Eine Flasche Puffer mit nicht-ionischem Detergens und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
Volumen:	50 ml/Fläschchen
Lagerung:	2 – 8 °C
Stabilität:	Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum. Nach dem Öffnen: Vier Wochen haltbar. Nach der Vorbereitung: Die Waschpuffer-Arbeitslösung ist nach der Vorbereitung 2 Wochen lang haltbar, vorausgesetzt, die Gute Laborpraxis wird eingehalten. Um mikrobielles Wachstum zu verhindern, sollte der Behälter, in dem die Waschpufferlösung zubereitet und gelagert wird, sauber sein und es wird empfohlen, die Waschpufferlösung bei Nichtgebrauch gekühlt (2 – 8 °C) zu lagern.
Vorbereitung der Waschpuffer-Arbeitslösung:	**X10** **Vor Gebrauch 1:10 verdünnen** Vor Gebrauch 1:10 in destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Mikrotiterplatte verwendet werden soll, geben Sie 50 ml des Waschpufferkonzentrats zu 450 ml deionisiertem oder destilliertem Wasser.

10. EMPFOHLENES ASSAY-LAYOUT



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

11. TESTVERFAHREN

Vorbehandlung der Probe: Keine
Alle Kitkomponenten, Kontrollen und Proben müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Standards, Kontrollen und Proben sollten jeweils in Doppelbestimmung angesetzt werden. Sobald das Verfahren begonnen wurde, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.

1.	Nachdem alle Kitkomponenten auf Raumtemperatur gebracht wurden, diese vorsichtig durch Schwenken **mischen**.
2.	Waschpuffer-Arbeitslösung **vorbereiten** (siehe Abschnitt *9. Mitgelieferte Reagenzien, 6. Waschpufferkonzentrat*).
3.	Die Belegung der Mikrotiterplatte für Standards, Kontrollen und Proben **planen**. Siehe Abschnitt *10. Empfohlenes Assay-Layout*. Nicht verwendete Streifen aus dem Mikrotiterplattenrahmen nehmen und diese in den Beutel mit Trockenmittel legen. Beutel mit den nicht verwendeten Streifen wieder verschließen und diesen in den Kühlschrank zurücklegen.
4.	Je **50 µl** Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechend gekennzeichneten Wells **pipettieren**.
5.	**100 µl** HRP-Konjugat in jedes Well **pipettieren** (die Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen).
6.	10 Sekunden lang vorsichtig auf den Rahmen der Mikrotiterplatte klopfen, um den Inhalt der Wells zu mischen und die Mikrotiterplatte **90 Minuten** lang bei Raumtemperatur **inkubieren** (nicht schütteln).
7.	Wells entweder mit einem automatischen Mikrotiterplattenwaschgerät (bevorzugt) oder manuell wie unten beschrieben **waschen**. Automatisch: Mit einem automatischen Mikrotiterplattenwaschgerät einen **3-Zyklus** mit **350 µl/Well** Waschpuffer-Arbeitslösung (3 x 350 µl) durchführen. Ein Zyklus besteht aus dem Absaugen aller Wells und anschließender Befüllung jedes Wells mit 350 µl Waschpuffer-Arbeitslösung. Nach dem letzten Waschzyklus alle Wells absaugen und die Mikrotiterplatte anschließend fest auf saugfähigem Papier ausklopfen, um Flüssigkeitsreste zu entfernen. Manuell: Zum manuellen Waschen einen **3-Zyklus** mit **350 µl/Well** Waschpuffer-Arbeitslösung (3 x 350 µl) durchführen. Ein Zyklus besteht aus dem Absaugen aller Wells, indem der Inhalt der Wells zügig über einem Abfallbehälter entleert wird und dem anschließenden Pipettieren von 350 µl der Waschpuffer-Arbeitslösung in jedes Well mit einer Mehrkanalpipette. Nach dem letzten Waschzyklus werden alle Wells entleert, indem der Inhalt zügig über einem Abfallbehälter entleert wird und die Mikrotiterplatte anschließend fest auf saugfähigem Papier ausgeklopft wird, um Flüssigkeitsreste zu entfernen.
8.	**150 µl** TMB-Substrat in jedes Well **pipettieren** (die Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen).
9.	Mikrotiterplatte **30 Minuten** lang bei Raumtemperatur **inkubieren** (nicht schütteln).
10.	**50 µl** Stopplösung in jedes Well (die Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen) in der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit wie bei der Zugabe des TMB-Substrats **pipettieren**. Vorsichtig auf den Mikrotiterplattenrahmen klopfen, um den Inhalt der Wells zu mischen.
11.	Die Optische Dichte (Absorption) in den Wells der Mikrotiterplatte mit einem Absorptions-Mikrotiterplattenlesegerät bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe der Stopplösung **messen**.

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

12. BERECHNUNGEN

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 Standardkurve zu erstellen.
3. Die Immunoassay-Software berechnet die Konzentrationen der Kontrollen und Proben anhand der mittleren optischen Dichtewerte und der Standardkurve.
4. Wenn eine Probe einen Wert von mehr als 2500 pg/ml aufweist und verdünnt und erneut getestet werden muss, verdünnen Sie sie mit einer Serumprobe mit einer bekannten niedrigen DHT-Konzentration (< 50 pg/ml) im Verhältnis von höchstens 1:10. Das erhaltene Ergebnis muss mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Bei der Bewertung der Gültigkeit der Testergebnisse sollten folgende Kriterien berücksichtigt werden:

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

14. TYPISCHE DATEN

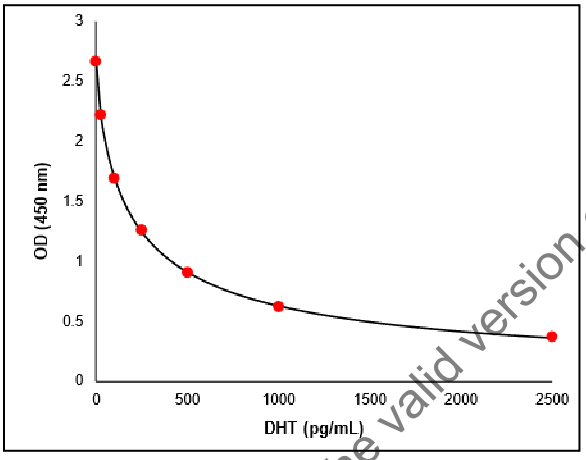
14.1 TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Nur Beispieldaten. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.

Standard	Mittlerer OD (450 nm)	% Bindung	Wert (pg/ml)
A	2,664	100	0
B	2,225	84	25
C	1,695	64	100
D	1,261	47	250
E	0,911	34	500
F	0,622	23	1000
G	0,372	14	2500
Unbekannt	1,077	–	353

14.2 TYPISCHE STANDARDKURVE

Nur Beispielkurve. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.



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

15. LEISTUNGSMERKMALE

15.1 SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivitätsstudie wurde gemäß der CLSI EP17-A2-Richtlinie durchgeführt. Sechzig Wiederholungen von Matrixproben und Proben mit niedrigen Konzentrationen 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 (LoQ) wurde auf 17,0 pg/ml festgelegt.

15.2 SPEZIFIZITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Die folgenden Verbindungen wurden auf Kreuzreaktivität getestet, wobei DHT zu 100% kreuzreagierte.

Verbindung	% Kreuzreaktivität
5α-DHT	100
17-Hydroxyprogesteron	< 0,01
17β-Estradiol	< 0,01
Aldosteron	< 0,01
Androstendion	0,6
Corticosteron	< 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
Testosteron	8,1

15.3 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.

15.4 PRÄZISION

Die Präzisionsstudie wurde gemäß der CLSI EP05-A2-Richtlinie durchgeführt.

Wiederholbarkeit
Das Versuchsprotokoll verwendete einen verschachtelten Varianzkomponentenplan mit 7 Serumproben, 10 Testtagen, zwei Lots und zwei Fachanwendern pro Tag. Jeder Fachanwender führte zwei Tests pro Tag und zwei Wiederholungsmessungen pro Durchgang (ein 10 x 2 x 2 x 2 Design) für jede Probe durch. Die Ergebnisse wurden mit einem *two-way nested ANOVA* analysiert und in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	Mittelwert (pg/ml)	Innerhalb des Laufs		Zwischen den Läufen		Gesamt	
		SD (pg/ml)	CV%	SD (pg/ml)	CV%	SD (pg/ml)	CV%
1	31,4	13,7	43,7	3,3	10,5	14,1	44,9*
2	144,2	19,3	13,4	8,5	5,9	21,0	14,6
3	817,5	51,7	6,3	21,1	2,6	55,8	6,8
4	429,5	34,5	8,0	10,8	2,5	36,8	8,6
5	586,2	38,8	6,6	15,5	2,6	41,8	7,1
6	1561	90,0	5,8	24,1	1,5	94,5	6,1
7	1287	71,1	5,5	18,5	1,4	73,4	5,7

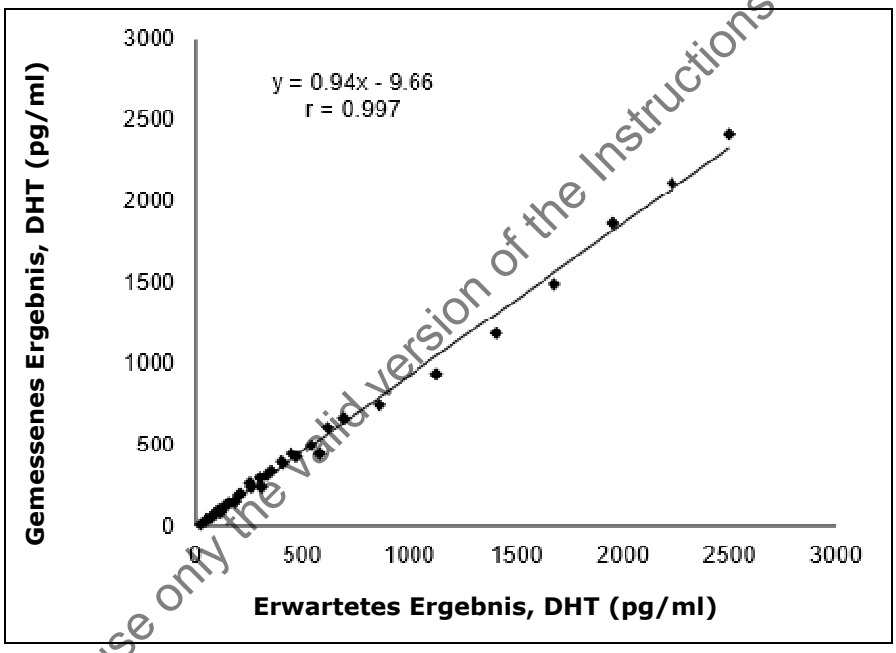
* Bei Proben, die nahe an der Bestimmungsgrenze liegen, ist mit einer höheren Ungenauigkeit zu rechnen. Der zulässige Gesamtfehler für Proben mit weniger als 145 pg/ml beträgt ± 30 pg/ml.[6]

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

Reproduzierbarkeit
In der Reproduzierbarkeitsstudie wurde die Präzisionsleistung des Assays nach dem Versuchsplanmodell 3 x 5 x 5 (3 Standorte x fünf Testtage x fünf Wiederholungen pro Tag) in Laboren in Italien, den USA und Kanada bewertet. Die Ergebnisse wurden mit einem *two-way nested ANOVA* analysiert und sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

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

15.5 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 prognostizierten Konzentration verglichen. Die statistische Analyse zeigt, dass der Assay bis zu einer Verdünnung von 1:10 ausreichend linear ist.



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

15.6 WIEDERFINDUNG

Zur Herstellung von aufgestockten Proben wurden vier Serumproben mit definierter Menge DHT (das in Serumproben mit hoher DHT-Konzentration vorhanden ist) zugesetzt. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind im Folgenden tabellarisch dargestellt:

Probe	Konzentration Ergebnis (pg/ml)	Konzentration der aufgestockten Probe (pg/ml)	Erwartete Konzentration von 9:1 V/V (pg/ml)	Wiederfindung %
1	91,3	–	–	–
	177,3	800	162,2	109,3
	230,2	1472	229,4	100,3
	313,8	2672	349,4	89,8
2	191,6	–	–	–
	261,0	800	252,5	103,4
	306,2	1472	319,7	95,8
	408,0	2672	439,7	92,8
3	379,5	–	–	–
	433,2	800	421,6	102,7
	499,5	1472	488,8	102,2
	573,3	2672	608,8	94,2
4	360,2	–	–	–
	383,2	800	404,2	94,8
	461,8	1472	471,4	98,0
	510,8	2672	591,4	86,4

15.7 VERGLEICHSSTUDIEN

Der DHT-ELISA-Kit (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:
$y = 0{,}78x + 73{,}8$, $r = 0{,}88$.

16. REFERENZBEREICHE

Die Referenzbereiche (95%) wurden anhand von Proben von erwachsenen Personen verschiedener ethnischer Abstammung ermittelt. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzwertbereiche festlegen.
ND = Nicht nachweisbar; niedriger als der LoD.

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

Die Referenzbereiche wurden anhand von pädiatrischen Proben geschätzt (siehe unten). Aufgrund des begrenzten Probenumfangs konnte kein 95%-iger Referenzbereich festgelegt werden; es wird der Gesamtbereich angegeben. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzwertbereiche festlegen.

Geschlecht	Alter (Jahre)	n	Gesamtbereich (pg/ml)
Männlich	1 – 9	40	ND – 85,7
	10 – 14	26	11,1 – 875,6
	15 – 18	14	70,3 – 1260,9
Weiblich	2 – 9	40	ND – 88,9
	10 – 14	21	22,5 – 280,6
	15 – 18	19	62,6 – 760,3

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

17. LITERATUR

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.

18. ÄNDERUNGSHISTORIE

Vorherige Version:	2.0	**Neue Version:**	3.0
Änderungen:	Neues IFU-Format mit nummerierten Überschriften. **1. VERWENDUNGSZWECK** Zusatz: Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch und den Laborgebrauch bestimmt. 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 VERWENDUNGSZWECK** 1 und 2 hinzugefügt. **5. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE** Zusätzliche Vorsichtsmaßnahmen und Warnungen hinzugefügt. Einige frühere Einschränkungen in diesem Abschnitt hinzugefügt. **8. BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE** Hinzufügung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschgeräts. **11. TESTVERFAHREN** Die Komponentennamen wurden überarbeitet, um den Symboldefinitionen zu entsprechen. **13. QUALITÄTSKONTROLLE** Neuer Abschnitt hinzugefügt. **15.4 PRÄZISION** **Reproduzierbarkeit** Neuer Abschnitt/Daten hinzugefügt. **18. ÄNDERUNGSHISTORIE** Neuer Abschnitt hinzugefügt. Hinzufügung der Abschnitte über Produktreklamationen, Garantie und Haftungsbeschränkung.		

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

Produktreklamationen
Bei Produktreklamationen muss der Benutzer dem Händler oder Hersteller schriftlich eine Beschreibung der Reklamation vorlegen und begleitende Daten und/oder Informationen liefern.

Garantie
Der Hersteller garantiert, dass das Produkt frei von Mängeln ist und innerhalb der Produktspezifikationen funktioniert, wenn das Produkt vor Ablauf des Verfalldatums, entsprechend dem vorgesehenen Zweck und der vorgesehenen Verwendung und gemäß der mit dem Produkt gelieferten Gebrauchsanweisung verwendet wird. Jegliche Abweichungen vom vorgesehenen Zweck und Gebrauch, von der Gebrauchsanweisung, Änderungen an den Kitkomponenten oder die Verwendung nach dem Verfalldatum führen zum Erlöschen der Garantieansprüche.

Haftungsbeschränkung
Der Hersteller haftet in allen Fällen, ob aus unerlaubter Handlung (einschließlich Fahrlässigkeit) oder nach dem Gewohnheitsrecht und für alle Schäden oder Verluste, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Gewinnverlust und Umsatzverluste, ob direkt, indirekt, als Folge, zufällig oder speziell, ist auf den Kaufpreis des/der betreffenden Produkts/Produkte beschränkt.

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	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten	CONT	Inhalt	CE	CE-Kennzeichnung
	Achtung	REF	Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				