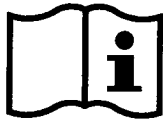


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Dihydrotestosterone (DHT) ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of 5 α -
Dihydrotestosterone in human serum



REF DE2330

 96

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE	4
2	SUMMARY AND EXPLANATION.....	4
3	TEST PRINCIPLE.....	4
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS	5
5	STORAGE AND STABILITY.....	5
6	SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE.....	5
7	MATERIALS SUPPLIED.....	6
8	MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED.....	6
9	PROCEDURE NOTES	7
10	PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS.....	7
11	TEST PROCEDURE.....	7
12	QUALITY CONTROL.....	8
13	CALCULATION OF RESULTS	8
14	EXPECTED VALUES	9
15	PERFORMANCE	9
1	ZWECKBESTIMMUNG	11
2	KLINISCHE BEDEUTUNG	11
3	TESTPRINZIP.....	11
4	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	12
5	LAGERUNG UND HALTBARKEIT	12
6	PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG.....	12
7	KOMPONENTEN DES KITS	13
8	ZUSÄTZLICHES MATERIAL (NICHT IM KIT ENTHALTEN)	13
9	HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG	14
10	TESTVORBEREITUNGEN.....	14
11	TESTDURCHFÜHRUNG.....	15
12	QUALITÄTSKONTROLLE	15
13	TESTAUSWERTUNG.....	15
14	NORMWERTE.....	15
15	TESTCHARAKTERISTIKA.....	16

1	USO PREVISTO	18
2	SOMMARIO E SPIEGAZIONI	18
3	PRINCIPIO DEL TEST	18
4	AVVERTENZE E PRECAUZIONI	18
5	CONSERVAZIONE E STABILITÀ	19
6	PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	19
7	MATERIALE FORNITO	19
8	MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI	20
9	NOTE PER LA PROCEDURA	20
10	ISTRUZIONI PRE-TEST	20
11	PROCEDURA DEL TEST	21
12	CONTROLLO DI QUALITÀ	21
13	CALCOLO DEI RISULTATI	21
14	VALORI ATTESI	22
15	PERFORMANCE	22
1	USO PROPUESTO.....	24
2	IMPLICACIONES CLÍNICAS	24
3	PRINCIPIO DEL ENSAYO	24
4	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.....	25
5	ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD	25
6	TOMA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS	25
7	MATERIALES SUMINISTRADOS	26
8	MATERIALES REQUIRIDOS PERO NO SUMINISTRADOS	26
9	INDICACIONES PARA EL PROCEDIMIENTO	27
10	INSTRUCCIONES PARA LA PREPARACIÓN DEL ENSAYO	27
11	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	28
12	CONTROL DE CALIDAD	28
13	CÁLCULO DE RESULTADOS	28
14	VALORES ESPERADOS	29
15	PRUEBAS FUNCIONALES	29
16	LITERATURE REFERENCES / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA	31
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS		32

1 INTENDED USE

Enzyme immunoassay for the *in-vitro-diagnostic* quantitative determination of 5 α -Dihydrotestosterone in human serum.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

5 α -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.

3 TEST PRINCIPLE

Solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the competition principle. An unknown amount of antigen present in the sample and a fixed amount of enzyme labelled antigen compete for the binding sites of the antibodies coated onto the wells. After incubation the wells are washed to stop the competition reaction. After the substrate reaction the intensity of the developed colour is inversely proportional to the amount of the antigen in the sample. Results of samples can be determined directly using the standard curve.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For *in-vitro diagnostic* use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. In case of severe damage of the kit package please contact your supplier in written form, latest one week after receiving the kit. Do not use damaged components in test runs, but keep safe for complaint related issues.
4. Obey lot number and expiry date. Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.
5. Follow good laboratory practice and safety guidelines. Wear lab coats, disposable latex gloves and protective glasses where necessary.
6. Reagents of this kit containing hazardous material may cause eye and skin irritations. See MATERIALS SUPPLIED and labels for details. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request.
7. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to national biohazard and safety guidelines or regulations.
8. The cleaning staff should be guided by the professionals regarding potential hazards and handling.
9. Avoid contact with Stop solution. It may cause skin irritations and burns.
10. All reagents of this kit containing human serum or plasma have been tested and were found negative for anti-HIV I/II, HBsAg and anti-HCV. However, a presence of these or other infectious agents cannot be excluded absolutely. For this reason reagents should be treated as potential biohazards in use and for disposal.

5 STORAGE AND STABILITY

The kit is shipped at ambient temperature and should be stored at 2 - 8 °C. Keep away from heat or direct sunlight. The storage and stability of specimens and prepared reagents is stated in the corresponding chapters. The microtiter strips are stable up to the expiry date of the kit in the broken, but tightly closed bag when stored at 2 - 8 °C. Once opened standards and controls should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen.

6 SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Serum

The usual precautions for venipuncture should be observed. It is important to preserve the chemical integrity of a blood specimen from the moment it is collected until it is assayed. Do not use grossly hemolytic, icteric or grossly lipemic specimens. Do not use specimens containing NaN₃ or Thimerosal, as they may lead to false results. Samples appearing turbid should be centrifuged before testing to remove any particulate material.

Storage	4 °C	≤ - 10 °C (Aliquots)	Keep away from heat or direct sunlight.
Stability	24 h	≥ 24 h	Avoid repeated freeze-thaw cycles.

7 MATERIALS SUPPLIED

Quantity	Symbol	Component
1 x 12 x 8	SORB MT	Microtiter Plate Break apart strips. coated with rabbit anti-DHT antibody (polyclonal).
1 x 0.25 mL	ENZ CONJ 100x	Enzyme Conjugate, Concentrate (100 x) ; Contains: DHT-HRP Conjugate, in protein-containing buffer, non-mercury preservatives.
1 x 2 mL	CAL	Standard A 0 pg/mL; Ready to use. Contains: Dihydrotestosterone, in protein-containing buffer, non-mercury preservatives. Exact concentrations see QC certificate.
5 x 1.0 mL	CAL	Standard B-F 25; 100; 500; 1000; 2500 pg/mL; Ready to use. Contains: Dihydrotestosterone, in protein-containing buffer, non-mercury preservatives. Exact concentrations see QC certificate.
1 x 1.0 mL	CONTROL high	Control High Ready to use. Contains: DHT in protein-containing buffer, non-mercury preservatives. Exact concentrations see QC certificate.
1 x 1.0 mL	CONTROL low	Control Low Ready to use. Contains: DHT in protein-containing buffer, non-mercury preservatives. Exact concentrations see QC certificate.
1 x 18 mL	SUB TMB	TMB Substrate Solution Ready to use. Contains: TMB and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.
1 x 8 mL	STOP SOLN	TMB Stop Solution Ready to use. 1 N acidic solution.
2 x 50 mL	BUF WASH 10x	Wash Buffer, Concentrate (10 x) ; Contains: Buffer with non-ionic detergent and non-mercury preservatives.
1 x 17 mL	BUF	Assay Buffer Ready to use. Contains: protein-containing buffer, non-mercury preservatives.

8 MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

1. Micropipettes (Multipette Eppendorf or similar devices, < 3% CV). Volume: 50, 100, 150, 300 µL
2. Vortex mixer
3. 8-Channel Micropipettor with reagent reservoirs
4. Wash bottle, automated or semi-automated microtiter plate washing system
5. Microtiter plate reader capable of reading absorbance at 450 nm (reference wavelength 600-650 nm)
6. Bidistilled or deionised water
7. Paper towels, pipette tips and timer

9 PROCEDURE NOTES

- Any improper handling of samples or modification of the test procedure may influence the results. The indicated pipetting volumes, incubation times, temperatures and pretreatment steps have to be performed strictly according to the instructions. Use calibrated pipettes and devices only.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption. Make sure that required reagents, materials and devices are prepared ready at the appropriate time. Allow all reagents and specimens to reach room temperature (18 °C - 25 °C) and gently swirl each vial of liquid reagent and sample before use. Mix reagents without foaming.
- Avoid contamination of reagents, pipettes and wells/tubes. Use new disposable plastic pipette tips for each component and specimen. Do not interchange caps. Always cap not used vials. Do not reuse wells/tubes or reagents.
- Some components contain $\leq 250 \mu\text{L}$ solution. Take care that the solution is completely on the bottom of the vial before opening.
- It is advised to determine samples in duplicate to be able to identify potential pipetting errors.
- Use a pipetting scheme to verify an appropriate plate layout.
- Incubation time affects results. All wells should be handled in the same order and time sequences. It is recommended to use an 8-channel Micropipettor for pipetting of solutions in all wells.
- Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with Wash Buffer, and that there are no residues in the wells.
- Humidity affects the coated wells/tubes. Do not open the pouch until it reaches room temperature. Unused wells/tubes should be returned immediately to the resealed pouch including the desiccant.

10 PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS

10.1 Preparation of lyophilized or concentrated components

Dilute / dissolve	Component	with	Diluent	Relation	Storage	Stability
50 mL	BUF WASH 10x	450 mL	bidist. water	1:10	2 - 8 °C	12 months
120 μL	ENZ CONJ 100x	12 mL	BUF	1:101	Discard any that is left over.	

Samples containing concentrations higher than the highest standard have to be diluted further up to 1:8 with Standard A and reassayed. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

11 TEST PROCEDURE

- Pipette **50 μL** of each **Calibrator, Control & sample** into the respective wells of the Microtiter Plate.
- Pipette **100 μL** of freshly prepared **Enzyme Conjugate (1:101)** into each well. Briefly mix contents by gently shaking the plate for 10 seconds.
- Incubate 1 h at RT (18 °C - 25 °C) without shaker.**
- Wash plate **3 x** with **300 μL** of diluted **Wash Buffer**. Remove excess solution by tapping the inverted plate on a paper towel.
- For adding of Substrate and Stop Solution use, if available, an 8-channel Micropipettor. Pipetting should be carried out in the same time intervals for Substrate and Stop Solution. Use positive displacement and avoid formation of air bubbles.
- Pipette **150 μL** of **TMB Substrate Solution** into each well. Briefly mix contents by gently shaking the plate for 10 seconds.
- Incubate 10 - 15 min at RT (18 °C - 25 °C)** without **shaker** or until calibrator A attains dark blue colour for desired OD.
- Stop the substrate reaction by adding **50 μL** of **TMB Stop Solution** into each well. Briefly mix contents by gently shaking the plate.
- Measure** optical density with a photometer at **450 nm*** within **20 min.**

*) If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 405 or 415 nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

12 QUALITY CONTROL

The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or comparable standards /laws. User and/or laboratory must have a validated system to get diagnosis according to GLP. All kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the vial labels. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls. In case of any deviation the following technical issues should be proven: Expiration dates of (prepared) reagents, storage conditions, pipettes, devices, incubation conditions and washing methods.

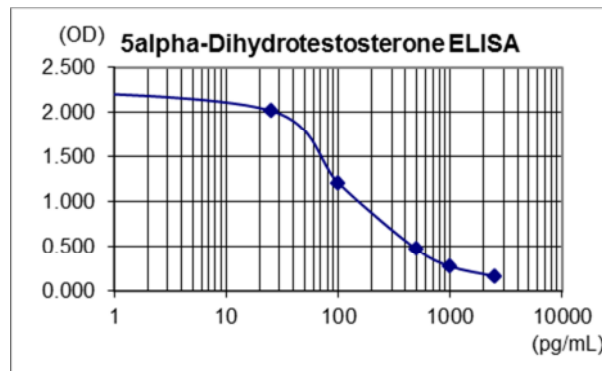
13 CALCULATION OF RESULTS

The obtained OD of the standards (y-axis, linear) are plotted against their concentration (x-axis, logarithmic) either on semi-logarithmic graph paper or using an automated method. A good fit is provided with cubic spline, 4 Parameter Logisitics or Logit-Log. For the calculation of the standard curve, apply each signal of the standards (one obvious outlier of duplicates might be omitted and the more plausible single value might be used). The concentration of the samples can be read directly from the standard curve. Samples showing concentrations above the highest standard have to be diluted as described in PRE-TEST SETUP INSTRUCTIONS and reassayed.

Typical Calibration Curve

(Example. Do not use for calculation!)

Standard	OD ₁	OD ₂	OD _{Mean}	Value (pg/mL)
A	2.285	2.273	2.279	0
B	2.025	2.019	2.022	25
C	1.211	1.212	1.212	100
D	0.468	0.479	0.474	500
E	0.286	0.270	0.278	1000
F	0.169	0.165	0.167	2500
Unknown	0.520	0.507	0.513	379.5



14 EXPECTED VALUES

It is recommended that each laboratory establishes its own range of normal values.

Group		Range (pg/mL)
Females	Premenopausal	24 - 368
	Postmenopausal	10 - 181
Males		250 - 990

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.

15 PERFORMANCE

15.1 Sensitivity

The lower detection limit is calculated from the standard curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Calibrator A (based on 20 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the 5 α -Dihydrotestosterone ELISA kit is 7.23 pg/mL.

15.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the 5 α -Dihydrotestosterone ELISA with dihydrotestosterone cross-reacting at 100%.

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

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

15.3 Intra-Assay Precision

Three samples were assayed twenty times each on the same calibrator curve. The results (in pg/mL) are tabulated below:

	Mean	SD	CV %
1	44.39	2.11	4.75
2	176.32	5.87	3.33
3	430.64	26.92	6.25

15.4 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	212.28	14.41	6.79
2	346.59	22.50	6.49
3	460.08	34.35	7.47

15.5 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

15.6 Linearity

Three patient serum samples were diluted with calibrator 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

15.7 Comparative Studies

The 5 α -Dihydrotestosterone ELISA (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

1 ZWECKBESTIMMUNG

Enzymimmunoassay für die *in-vitro Diagnostik* zur quantitativen Bestimmung von 5 α -Dihydrotestosteron in humanem Serum.

2 KLINISCHE BEDEUTUNG

5 α -Dihydrotestosteron (DHT) ist ein ähnliches Steroid wie Testosteron und Androstenedion 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 Androstenedion 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 Anarchie 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.

3 TESTPRINZIP

Kompetitiver Enzymimmunoassay (ELISA). Die unbekannte Menge an Antigen in der Probe und eine bekannte Menge an enzymmarkiertem Antigen (E-Ag) konkurrieren um die Bindungsstellen des an die Wells der Mikrotiterstreifen gebundenen Antikörpers. Nach der Inkubation wird nicht gebundenes E-Ag durch Waschen entfernt. Die Intensität der gebildeten Farbe nach der Substratreaktion ist umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben. Die Ergebnisse der Proben können direkt anhand der Standardkurve bestimmt werden.

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Nur zum *In-vitro-Gebrauch*. Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal.
2. Vor der Testdurchführung sollte die Arbeitsanleitung vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
3. Im Falle einer erheblichen Beschädigung der Testpackung ist der jeweilige Lieferant innerhalb einer Woche nach Empfang der Ware schriftlich zu benachrichtigen. Beschädigte Komponenten dürfen nicht zur Testdurchführung verwendet werden, sondern sollten solange aufbewahrt werden, bis der Transportschaden endgültig geregelt ist.
4. Chargen-Nummer und Verfallsdatum beachten. Es dürfen keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen in einem Test verwendet werden. Verfallene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
5. Gute Laborpraxis und Sicherheitsrichtlinien beachten. Je nach Bedarf sollten Laborkittel, Einmal-Latexhandschuhe und Schutzbrillen getragen werden.
6. Reagenzien dieses Kits, die Gefahrstoffe enthalten, können Reizungen der Augen und der Haut hervorrufen. Siehe Angaben in KOMPONENTEN DES KITS und auf den Etiketten. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage erhältlich.
7. Chemikalien und vorbereitete oder gebrauchte Reagenzien sind unter Beachtung der jeweiligen nationalen Bestimmungen als Gefahrstoffabfall zu entsorgen.
8. Das Reinigungspersonal ist durch das Fachpersonal bezüglich möglicher Gefahren und Umgang anzuleiten.
9. Kontakt mit Stopplösung vermeiden. Kann Hautreizungen und Verätzungen hervorrufen.
10. Alle Reagenzien dieses Kits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, ergaben bei der Prüfung auf anti-HCV, HBsAg bzw. Antikörper gegen HIV I/II-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

5 LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Der Kit wird bei Umgebungstemperatur angeliefert und sollte bei 2 - 8 °C gelagert werden. Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Hinweise zur Lagerung und Haltbarkeit der Proben und vorbereiteten Reagenzien sind den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen. Die Mikrotiterplatte ist auch nach dem Öffnen der Verpackung bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar, wenn der Beutel sorgfältig wieder verschlossen und bei 2 - 8 °C gelagert wird. Standards und Kontrollen müssen nach dem Öffnen innerhalb von 14 Tagen aufgebraucht oder aliquotiert bei -20 °C gelagert werden.

6 PROBENGEWINNUNG UND -AUFBEWAHRUNG

Serum

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Blutabnahme sind einzuhalten. Die chemische Integrität der Blutproben muss vom Zeitpunkt der Blutabnahme bis zur Testdurchführung erhalten bleiben. Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden. Proben, die Natriumazid oder Thimerosal enthalten, sollten nicht verwendet werden, da sie zu falschen Ergebnissen führen können. Getrübte Proben sollten vor der Testdurchführung zentrifugiert werden, um Partikel zu entfernen.

Lagerung	4 °C	≤ - 10 °C (aliquotiert)	Vor Hitze und Sonneneinstrahlung schützen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.
Haltbarkeit	24 h	≥ 24 h	

7 KOMPONENTEN DES KITS

Anzahl / Menge	Symbol	Komponente
1 x 12 x 8	SORB MT	Mikrotiterplatte Wells einzeln abbrechbar. beschichtet mit Kaninchen-anti-DHT-Antikörper (polyklonal).
1 x 0,25 mL	ENZ CONJ 100x	Enzymkonjugat , Konzentrat (100 x) Enthält: DHT-HRP Konjugat, in Protein-Puffer, Quecksilberfreie Konservierungsmittel.
1 x 2 mL	CAL	Standard A 0 pg/mL; Gebrauchsfertig. Enthält: Dihydrotestosteron, in Protein-Puffer, Quecksilberfreie Konservierungsmittel. Genaue Konzentrationen siehe QC Zertifikat.
5 x 1,0 mL	CAL	Standard B-F 25; 100; 500; 1000; 2500 pg/mL; Gebrauchsfertig. Enthält: Dihydrotestosteron, in Protein-Puffer, Quecksilberfreie Konservierungsmittel. Genaue Konzentrationen siehe QC Zertifikat.
1 x 1,0 mL	CONTROL high	Kontrolle Hoch Gebrauchsfertig. Enthält: DHT in Protein-Puffer, Quecksilberfreie Konservierungsmittel. Genaue Konzentrationen siehe QC Zertifikat.
1 x 1,0 mL	CONTROL low	Kontrolle Niedrig Gebrauchsfertig. Enthält: DHT in Protein-Puffer, Quecksilberfreie Konservierungsmittel. Genaue Konzentrationen siehe Fläschchenetiketten oder QC Zertifikat.
1 x 18 mL	SUB TMB	TMB Substratlösung Gebrauchsfertig. Enthält: TMB und Wasserstoffperoxid in einem DMF- oder DMSO-freien Puffer.
1 x 8 mL	STOP SOLN	TMB Stopplösung Gebrauchsfertig. 1 N saure Lösung.
2 x 50 mL	BUF WASH 10x	Waschpuffer , Konzentrat (10 x) Enthält: Puffer mit nicht-ionischem Detergenz und Quecksilberfreie Konservierungsmittel.
1 x 17 mL	BUF	Assaypuffer Gebrauchsfertig. Enthält: Protein-Puffer, Quecksilberfreie Konservierungsmittel.

8 ZUSÄTZLICHES MATERIAL (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

1. Pipetten (Multipette Eppendorf oder vergleichbare Produkte, < 3% VK). Volumina: 50, 100, 150, 300 µL
2. Vortex-Mischer
3. 8-Kanal Mikropipette mit Reagenziengefäßen
4. Waschflasche, automatisches oder halbautomatisches Waschsysteem für Mikrotiterplatten
5. Messgerät für Mikrotiterplatten zur Messung der Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 600-650 nm)
6. Bidest. oder deionisiertes Wasser
7. Papiertücher, Pipettenspitzen, Stoppuhr

9 HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

1. Fehler bei der Handhabung der Proben oder Abweichungen von der beschriebenen Testdurchführung können die Ergebnisse verfälschen. Die angegebenen Pipettiervolumina, Inkubationszeiten, Temperaturen und Vorbereitungsschritte sind unbedingt gemäß Arbeitsanleitung einzuhalten. Nur kalibrierte Pipetten und Geräte verwenden.
2. Sobald mit der Testdurchführung begonnen wird, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden. Es ist sicherzustellen, dass alle benötigten Reagenzien, Geräte und Hilfsmittel zur rechten Zeit zur Verfügung stehen. Alle Reagenzien und Proben müssen auf Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) gebracht und vor Gebrauch vorsichtig ohne Schaumbildung gemischt werden.
3. Kontaminationen der Reagenzien, Pipetten und Wells/Röhrchen sind zu vermeiden. Neue Einmal-Pipettenspitzen für jede zu pipettierende Komponente und jede Probe verwenden. Die Deckel der Fläschchen nicht vertauschen. Nicht benötigte Fläschchen immer verschlossen halten. Wells/Röhrchen oder Reagenzien dürfen nicht wiederverwendet werden.
4. Enthalten Komponenten $\leq 250 \mu\text{L}$ Flüssigkeit, sollte sich vor dem Öffnen der gesamte Inhalt auf dem Boden des entsprechenden Fläschchens befinden.
5. Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen, um eventuelle Pipettierfehler zu erkennen.
6. Es sollte ein Pipettierschema verwendet werden um die Identifikation der Standards und Proben auf der Platte sicherzustellen.
7. Die Inkubationszeiten beeinflussen die Ergebnisse. Bei jedem Pipettierschritt sollten alle Wells in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeittakt behandelt werden. Die Verwendung einer 8-Kanal-Mikropipette zum Pipettieren in alle Wells wird empfohlen.
8. Die korrekte Durchführung der Waschschrte ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette oder eines automatischen Waschsystems für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausschütteln dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Wells vollständig und gleichmäßig mit Waschpuffer gefüllt werden und nach dem Ausschütteln kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt.
9. Feuchtigkeit beeinflusst die beschichteten Wells/Röhrchen. Verpackung nicht öffnen bevor Raumtemperatur erreicht ist. Nicht benötigte Wells/Röhrchen sofort in den wieder verschließbaren Beutel mit Trockenmittel zurückgeben.

10 TESTVORBEREITUNGEN

10.1 Vorbereitung lyophilisierter oder konzentrierter Komponenten

Verd. / rekonst.	Komponente	mit	Diluent	Verhältnis	Lagerung	Haltbarkeit
50 mL	BUF WASH 10x	450 mL	bidest. Wasser	1:10	2 - 8 °C	12 Monate
120 μL	ENZ CONJ 100x	12 mL	BUF	1:101	Alles verwerfen, das übrig ist.	

Proben, die eine höhere Konzentration als der höchste Standard aufweisen, müssen weiter mit Standard A im Verhältnis von höchstens 1:8 verdünnt und erneut getestet werden. Das Ergebnis wird mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

11 TESTDURCHFÜHRUNG

1. **50 µL** von jedem **Standard**, jeder **Kontrolle und Probe** in die entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte **pipettieren**.
2. Je **100 µL** frisch hergestelltes **Enzymkonjugat (1:101)** in jedes Well **pipettieren**. Platte kurz schütteln (10 Sekunden).
3. **Ohne Schütteln 1 h** bei **RT (18 °C - 25 °C)** inkubieren.
4. Platte **3 x** mit **300 µL** verdünntem **Waschpuffer** waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
5. Substrat- und Stopplösung möglichst mit einer 8-Kanal-Pipette pipettieren und Substrat- und Stopplösung in denselben Zeitintervallen zugeben. Mit positivem Vorhub pipettieren, um die Bildung von Luftbläschen zu vermeiden.
6. Je **150 µL TMB Substratlösung** in jedes Well **pipettieren**. Platte kurz schütteln (10 Sek.).
7. **Ohne Schütteln 10 - 15 min** bei **RT (18 °C - 25 °C)** inkubieren oder bis Standard A eine dunkelblaue Farbe für die gewünschte OD erreicht.
8. Die Substratreaktion durch Zugabe von je **50 µL TMB Stopplösung** in jedes Well stoppen. Platte kurz schütteln.
9. Die Optische Dichte mit einem Photometer bei **450 nm*** innerhalb von **20 min messen**.

*) Wenn die OD die höchste Erkennungsgrenze überschreitet oder kein 450 nm Filter verfügbar ist, kann auch ein 405 oder 415 nm Filter verwendet werden. Die optischen Dichten werden dann niedriger sein. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf das Ergebnis der Patienten-/Kontrollproben.

12 QUALITÄTSKONTROLLE

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn der Test gemäß der vorliegenden Arbeitsanleitung abgearbeitet wurde. Ferner muss der Anwender die GLP- Regeln (Good Laboratory Practice) oder vergleichbare Normen/Gesetze beachten. Anwender und/oder Labor müssen zur Diagnosestellung ein gemäß GLP validiertes System verwenden. Alle Kit-Kontrollen müssen innerhalb der Akzeptanzbereiche, die auf den Etiketten angegeben sind, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, sind die Ergebnisse ungültig und der Test sollte wiederholt werden. Jedes Labor sollte darüber hinaus laborinterne Kontrollen mitführen. Bei Abweichungen sind die folgenden Fehlermöglichkeiten zu überprüfen: Haltbarkeit der (vorbereiteten) Reagenzien, Lagerungsbedingungen, Pipetten, Geräte und Hilfsmittel, Inkubationsbedingungen und Waschmethoden.

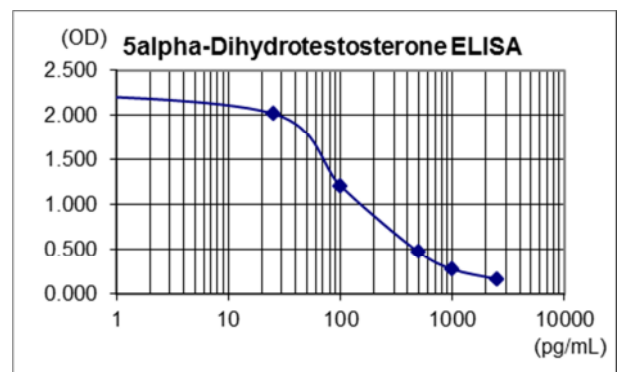
13 TESTAUSWERTUNG

Die erhaltenen OD der Standards (y-Achse, linear) gegen deren Konzentration (x-Achse, logarithmisch) auftragen, entweder auf semi-logarithmischem Papier oder durch ein entsprechendes Computerprogramm. Bei Verwendung eines Computerprogramms werden die Cubic-Spline-Methode, 4-Parameter-Analyse (lin-log) oder Logit-Log-Berechnung empfohlen. Zur Berechnung der Standardkurve sollten alle Werte der Standards verwendet werden (bei Doppelwerten kann ein offensichtlicher Ausreißerwert eliminiert und stattdessen der plausible Einzelwert verwendet werden). Die Konzentrationen der Proben können direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen werden, müssen wie in TESTVORBEREITUNGEN beschrieben verdünnt und erneut analysiert werden.

Typische Standardkurve

(Beispiel. Nicht zur Testauswertung verwenden!)

Standard	OD ₁	OD ₂	OD _{Mittelwert}	Wert (pg/mL)
A	2.285	2.273	2.279	0
B	2.025	2.019	2.022	25
C	1.211	1.212	1.212	100
D	0.468	0.479	0.474	500
E	0.286	0.270	0.278	1000
F	0.169	0.165	0.167	2500
Unknown	0.520	0.507	0.513	379.5



14 NORMWERTE

Jedes Labor sollte unter Berücksichtigung regionaler Gegebenheiten eigene Normalwertbereiche erstellen.

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

Die mit diesem Kit ermittelten Ergebnisse sollten nicht die einzige Basis für klinische Diagnosestellungen darstellen. Das Auftreten von heterophilen Antikörpern bei Patienten, die regelmäßig in Kontakt mit Tieren oder tierischen Produkten kommen, kann beispielsweise Störungen in immunologischen Tests verursachen. Folglich sollten klinische Diagnosen alle Aspekte der Patientengeschichte, inkl. der Häufigkeit des Kontakts mit tierischen Produkten, berücksichtigen, wenn falsche Ergebnisse vermutet werden.

15 TESTCHARAKTERISTIKA

15.1 Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze wird aus der Standardkurve berechnet mittels Bestimmung der Ergebniskonzentration der mittleren OD des Standards A (basierend auf 20 Doppelbestimmungen) minus 2 SD. Die Sensitivität des 5 α Dihydrotestosteron ELISA Kit beträgt somit 7,23 pg/mL.

15.2 Spezifität (Kreuzreaktivität)

Die folgenden Verbindungen wurden mit dem 5 α Dihydrotestosteron ELISA Kit auf ihre Kreuzreaktivität getestet, wobei Dihydrotestosteron eine Kreuzreaktivität von 100% hat.

Steroid	% Kreuzreaktivität
Dihydrotestosteron	100
Testosteron	8.7
5 β Dihydrotestosteron	2.0
Androstenedion	0.2

Die folgenden Steroide wurden getestet, wiesen jedoch eine Kreuzreaktivität von weniger als 0.01 % auf:

Dehydroepiandrosteron-Sulfat, 17 β -Estradiol, Estriol, Estron, Progesteron, 17-OH Progesteron, Cortisol, und Pregnenolon.

15.3 Intra-Assay-Präzision

Es wurden drei Proben je zwanzigmal mit derselben Standardkurve getestet. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (in pg/mL):

Probe	Mittelwert	SD	VK %
1	44.39	2.11	4.75
2	176.32	5.87	3.33
3	430.64	26.92	6.25

15.4 Inter-Assay-Präzision

Über einen Zeitraum von vier Wochen wurden drei Proben zehnmal getestet. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (in pg/mL):

Probe	Mittelwert	SD	VK %
1	212.28	14.41	6.79
2	346.59	22.50	6.49
3	460.08	34.35	7.47

15.5 Wiederfindung

Die nativen Proben wurden durch Zugabe bestimmter Menge an DHT zu drei Patientenserumproben hergestellt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (in pg/mL):

Probe	Gemessenes Ergebnis	Erwartetes Ergebnis	Wiederfindung %
1 Nativ	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 Nativ	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 Nativ	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

15.6 Linearität

Es wurden drei Patientenserumproben mit Standard A verdünnt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (in pg/mL):

Probe	Gemessenes Ergebnis	Erwartetes Ergebnis	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

15.7 Vergleichbare Studien

Der 5 α Dihydrotestosterone ELISA Kit (Kit A) wurde mit einem Konkurrenz RIA Kit mit beschichteten Glasröhrchen (Kit B) verglichen.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt (in pg/mL):

Gruppe	N	Mittelwert Kit A	Mittelwert Kit B
Frauen	10	95.5	99.0
Männer	10	280.0	252.0

1 USO PREVISTO

Saggio immunoenzimatico per la *diagnostica-in-vitro* per la determinazione quantitativa di 5 α -Dihydrotestosterone (DHT) nel siero umano.

2 SOMMARIO E SPIEGAZIONI

Il 5 α -Dihydrotestosterone (DHT) è uno steroide simile al testosterone e all'androstenedione e, come loro, appartiene alla classe degli androgeni. Il DHT è uno steroide C19 che possiede attività androgenica. La gran parte della produzione degli androgeni avviene nelle cellule di Leydig del testicolo. Gli androgeni circolano nel siero principalmente legati alla sex hormone binding globulin (SHBG) e all'albumina. Una piccola parte di questi ormoni si trova in circolo non legata alle proteine vettrici; questa parte si chiama frazione libera. L'affinità del DHT per l'SHBG è tre volte quella del testosterone. Negli uomini il 70% circa del DHT deriva dalla conversione periferica del testosterone, nelle donne dell'androstenedione. Gli androgeni vengono metabolizzati principalmente dal fegato; alcuni metaboliti vengono riutilizzati, altri vengono eliminati con le urine. Uso clinico del dosaggio. Nella sindrome di Klinefelter i livelli di DHT sono molto più bassi rispetto a quelli dei soggetti maschi normali. Nell'irsutismo idiopatico circa il 40% delle pazienti presenta livelli aumentati di DHT. Nella sindrome dell'ovaio policistico circa il 35% delle pazienti presenta livelli aumentati di DHT. Nei maschi giovani si trovano valori più elevati di DHT rispetto ai soggetti anziani, poiché i valori aumentano con la pubertà e contribuiscono alla mascolinizzazione del soggetto. Poiché il DHT viene prodotto nei tubuli seminiferi, un loro danneggiamento provoca la diminuzione dei livelli circolanti di DHT (pazienti con aplasia delle cellule germinali azoospermia). Nei pazienti con anorchia si trovano livelli molto bassi di DHT. In alcuni tumori alla prostata, specialmente nello stadio D, i livelli di DHT possono essere utilizzati per valutare la risposta alla terapia anti androgenica.

3 PRINCIPIO DEL TEST

Test immunoenzimatico assorbente su fase solida (ELISA) basato sul principio di competizione. Una quantità sconosciuta dell'antigene presente nel campione e una quantità fissa di antigene legato all'enzima competono per i siti di legame sugli anticorpi che rivestono i pozzetti. Dopo incubazione i pozzetti vengono lavati per bloccare la reazione di competizione. Successivamente alla reazione del substrato l'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla quantità dell'antigene presente nel campione. I risultati dei campioni possono essere determinati direttamente usando la curva standard.

4 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Solo per uso *diagnostico in-vitro*. Solo per uso professionale.
2. Leggere attentamente le istruzioni prima di iniziare il test. Utilizzare il manuale fornito nel kit. Assicurarci di aver compreso tutte le indicazioni.
3. In caso di danneggiamento del kit contattare il Vostro fornitore entro 1 settimana dal ricevimento della merce. Non utilizzare i componenti danneggiati ma conservarli per fornire prove del danno assieme al reclamo che inoltrerete al produttore/fornitore.
4. Rispettare lotto e scadenze. Non scambiare o mescolare tra loro reagenti di lotti diversi. Non usare i reagenti scaduti.
5. Attenersi alle Buone Pratiche di Laboratorio e alle direttive di sicurezza. Indossare camici, guanti in lattice e occhiali protettivi se necessario.
6. Alcuni reagenti del kit contengono sostanze pericolose che potrebbero causare irritazioni a pelle ed occhi. Consultare la sezione MATERIALE FORNITO e le etichette per i dettagli precisi. Schede di sicurezza del prodotto sono disponibili o su richiesta specifica ad fornitore.
7. I reagenti preparati e usati e le sostanze chimiche del kit devono essere trattati come rifiuti pericolosi secondo le normative di sicurezza e la legislazione vigente nel Paese in cui il prodotto viene usato.
8. Il personale delle pulizie dev'essere informato dal personale specializzato sui possibili rischi e sulle procedure da adottare.
9. Evitare il contatto con la soluzione stop. Può causare irritazioni e ustioni della pelle.
10. Tutti i reagenti del kit contenenti siero umano o plasma sono risultati negativi rispetto a HIV I/II, HBsAg e HCV. Si raccomanda tuttavia di trattarli come potenzialmente pericolosi poiché non si può escludere in maniera assoluta la presenza di questi o di altri agenti infettivi.

5 CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Il kit è spedito e trasportato a temperatura ambiente e deve essere conservato a 2 - 8 °C. Non esporre a luce solare diretta e ad alte temperature. L'informazioni relative a conservazione e stabilità di tutti i reagenti e dei campioni sono riportate nel capitolo corrispondente. La piastra microtitrata aperta è stabile fino a scadenza del kit se conservata nel suo involucro ben chiuso riposta a 2 - 8 °C. Dopo l'apertura gli standard e gli controlli possono essere conservati 14 giorni a 2 - 8 °C o, suddivisi in aliquote, a -20 °C o a temperature inferiori per periodi più lunghi.

6 PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Siero

Osservare le classiche precauzioni durante il prelievo venoso. Conservare l'integrità del campione di sangue dal momento del prelievo al momento dell'esecuzione del test. Non usare campioni emolizzati, itterici o lipemici. Non usare campioni che contengono NaN_3 o Thimerosal poiché possono portare a risultati falsi. I campioni torbidi devono essere centrifugati per rimuovere il materiale particolato al loro interno.

Conservazione:	4 °C	≤ - 10 °C (Aliquote)	Non esporre alla luce solare diretta e al calore. Evitare la ripetizione di cicli di congelamento/scongelo.
Stabilità:	24 h	≥ 24 h	

7 MATERIALE FORNITO

Quantità	Simbolo	Componente
1 x 12 x 8	SORB MT	Micropiastra Strisce separabili. Coniugato con anticorpo di anti-coniglio-DHT (policlonale).
1 x 0,25 mL	ENZ CONJ 100x	Coniugato Enzimatico , Concentrato (100 x) Contiene: DHT-HRP Coniugato, in tampone contenente proteine, conservativos libero da mercurio.
1 x 2 mL	CAL	Standard A ; 0 pg/mL Pronto/a all'uso. Contiene: Diidrotestosterone, in tampone contenente proteine, conservativos libero da mercurio. Per le concentrazioni esatte vedere il certificato di Controllo Qualità.
5 x 1,0 mL	CAL	Standard B-F ; 25; 100; 500; 1000; 2500 pg/mL Pronto/a all'uso. Contiene: Diidrotestosterone, in tampone contenente proteine, conservativos libero da mercurio. Per le concentrazioni esatte vedere il certificato di Controllo Qualità.
1 x 1,0 mL	CONTROL high	Controllo Elevato Pronto/a all'uso. Contiene: DHT in tampone contenente proteine, conservativos libero da mercurio. Per le concentrazioni esatte vedere il certificato di Controllo Qualità.
1 x 1,0 mL	CONTROL low	Controllo Basso Pronto/a all'uso. Contiene: DHT in tampone contenente proteine, conservativos libero da mercurio. Per le concentrazioni esatte vedere il certificato di Controllo Qualità.
1 x 18 mL	SUB TMB	Soluzione Substrato TMB Pronto/a all'uso. Contiene: TMB e perossido di idrogeno in un tampone libero da DMF o DMSO.
1 x 8 mL	STOP SOLN	Soluzione Stop TMB Pronto/a all'uso. 1 N acido soluzione.
2 x 50 mL	BUF WASH 10x	Tampone Lavaggio , Concentrato (10 x) Contiene: Tampone con detergente non-ionico e conservativos libero da mercurio.
1 x 17 mL	BUF	Tampone Saggio Pronto/a all'uso. Contiene: tampone contenente proteine, conservativos libero da mercurio.

8 MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

1. Micropipette (Multipette Eppendorf o similari, < 3% CV). Volumi: 50, 100, 150, 300 µL
2. Vortex mixer
3. Micropipetta 8-Canali con contenitori per reagenti
4. Spruzzetta per lavaggi, lavatore per micropiastre automatico o semi automatico
5. Lettore per micropiastre in grado di leggere ad assorbanza di 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento 600-650 nm)
6. Acqua bidistillata o deionizzata
7. Carta assorbente, puntali per pipette e timer

9 NOTE PER LA PROCEDURA

1. Qualsiasi manipolazione impropria dei campioni o modifica alla procedura può compromettere i risultati. Rispettare rigorosamente i volumi, i tempi e le temperature di incubazione e i passaggi di pretrattamento dei campioni indicati in metodica. Utilizzare pipette calibrate.
2. Una volta iniziato il test completare tutti i passaggi senza interruzioni. Assicurarsi che tutti i reagenti siano stati precedentemente preparati in tempo utile. Far raggiungere la temperatura ambiente ai campioni e ai componenti del kit (18 °C – 25 °C) e mescolare delicatamente ciascun reattivo liquido e campione prima dell'uso. Non creare schiuma durante il mescolamento.
3. Evitare la contaminazione di reagenti, pipette, pozzetti o provette. Usare puntali di plastica nuovi per ogni reagente, standard e campione. Non scambiare i tappi tra loro. Tappare sempre i flaconi non utilizzati. Non riutilizzare pozzetti/provette o reagenti.
4. Alcuni componenti contengono un volume ≤ 250 µL di soluzione. Assicurarsi che la soluzione sia sul fondo del flacone prima di aprirlo.
5. Si consiglia di saggiare i campioni in doppio per poter identificare eventuali errori di pipettamento.
6. Usare uno schema di pipettamento per realizzare un'appropriata distribuzione sulla piastra.
7. Il tempo di incubazione influisce sui risultati. Tutti i pozzetti dovrebbero essere dispensati nello stesso ordine e sequenza temporale. Si raccomanda una pipetta multicanale a 8 canali per pipettare le soluzioni in tutti i pozzetti.
8. Il lavaggio della micropiastra è importante. Pozzetti lavati in modo inappropriato possono portare a risultati erranei. Si raccomanda una pipetta multicanale o un lavatore automatico per piastre. Non far asciugare i pozzetti tra le varie incubazioni. Non graffiare i pozzetti rivestiti durante risciacqui e aspirazioni. Risciacquare e versare i reagenti con cura. Durante i risciacqui assicurarsi che i pozzetti siano ben riempiti con la soluzione di lavaggio e che non ci siano residui nei pozzetti.
9. L'umidità influisce sui pozzetti/tubi rivestiti. Non aprire l'involucro finché non ha raggiunto la temperatura ambiente. Riporre immediatamente i tubi/pozzetti non utilizzati nell'involucro con il dissecante.

10 ISTRUZIONI PRE-TEST**Preparazione di componenti liofilizzati o concentrati**

Diluire/ dissolvere	Componente	con	Diluente	Rapporto	Conservazione	Stabilità
50 mL	BUF WASH 10x	450 mL	acqua bidist.	1:10	2 - 8 °C	12 mesi
120 µL	ENZ CONJ 100x	12 mL	BUF	1:101	Scartare il reattivo diluito avanzato.	

Campioni contenenti concentrazioni più elevate dello standard massimo devono essere diluiti ulteriormente fino ad una proporzione 1:8 con lo standard A e dosati nuovamente.

11 PROCEDURA DEL TEST

1. Pipettare **50 µL** di ogni **Standard, Controlli e campione** nei rispettivi pozzetti della Micropietra.
2. Pipettare **100 µL** di **Coniugato Enzimatico (1:101)** appena preparato in ogni pozzetto. Mescolare delicatamente il contenuto agitando leggermente la piastra per 10 secondi.
3. **Incubare 1 h a TA (18 - 25 °C) senza agitatore.**
4. Lavare la piastra **3 x** con **300 µL** di **Tampone di Lavaggio** diluiti. Rimuovere l'eccesso di soluzione picchiettando la piastra capovolta su una salvietta di carta.
5. Per aggiungere le Soluzioni Substrato e Stop usare, possibilmente, una micropipetta 8-canali. Pipettare con intervalli di tempo costanti per le Soluzioni Stop e Substrato. Usare uno spostamento positivo ed evitare la formazione di bolle d'aria.
6. Pipettare **150 µL** di **Soluzione Substrato TMB** in ogni pozzetto. Mescolare delicatamente il contenuto agitando leggermente la piastra per 10 secondi.
7. **Incubare 10 - 15 min a TA (18 - 25 °C) senza agitatore** o fino al standard A ottiene il colore di blu scuro per la DO desiderata..
8. Fermare la reazione del substrato aggiungendo in ogni pozzetto **50 µL** di **Soluzione Stop TMB**. Mescolare delicatamente il contenuto agitando leggermente la piastra.
9. **Misurare** la densità ottica con un fotometro a **450 nm*** entro **20 min**.

*) Se la DO supera il limite massimo di riscontro o se non è disponibile un filtro da 450 nm, si può sostituire con un filtro da 405 o 415 nm. Le densità ottiche saranno inferiori, tuttavia questo non modificherà i risultati dei campioni dei pazienti/di controllo.

12 CONTROLLO DI QUALITÀ

I risultati del test sono validi solo se il test è stato eseguito seguendo le istruzioni per l'uso. L'utente deve inoltre attenersi rigorosamente ai principi della BPL (Buona Pratica di Laboratorio) o a norme equivalenti. Gli utenti e il laboratorio devono avere un sistema di formulazione della diagnosi conforme alle Buone Pratiche di Laboratorio. Tutti i controlli devono risultare compresi entro gli intervalli accettabili indicati sulle etichette delle fiale. Se i criteri non sono soddisfatti il test non è valido e dovrebbe essere ripetuto. Ogni laboratorio dovrebbe usare campioni noti come ulteriori controlli. In caso di deviazioni devono essere forniti i seguenti dati: Scadenza dei reagenti (preparati), condizioni di conservazione, pipette, strumenti, condizioni di incubazione e metodi di lavaggio.

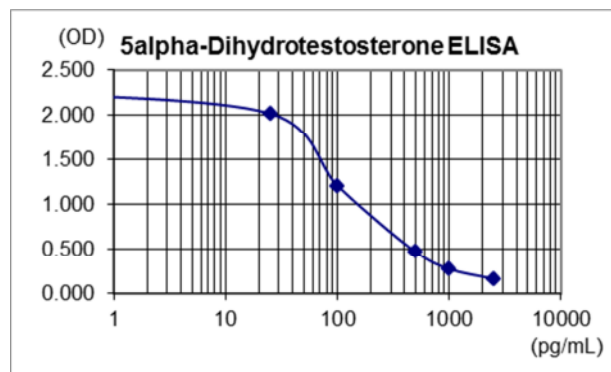
13 CALCOLO DEI RISULTATI

La DO ottenute per gli standard (asse y, lineare) sono messe in grafico rispetto alla loro concentrazione (asse x, logaritmico) sia su carta per grafico semilogaritmico che con metodo automatico. Buoni risultati si ottengono con grafici cubic spline, 4 Parametri Logistica o Logit-Log. Per il calcolo della curva standard utilizzare ogni segnale degli standard (omettere ovviamente i valori dei duplicati molto al di fuori dei risultati attesi e impiegare il valore singolo più plausibile). La concentrazione dei campioni può essere ricavata dalla curva standard. I campioni con concentrazioni superiori al più alto degli standards devono essere diluiti come descritto nel paragrafo ISTRUZIONI PRE-TEST e ritestati.

Tipica Curva di Calibrazione

(Esempio. Non usare per il calcolo!)

Standard	DO ₁	DO ₂	DO _{Media}	Valore (pg/mL)
A	2.285	2.273	2.279	0
B	2.025	2.019	2.022	25
C	1.211	1.212	1.212	100
D	0.468	0.479	0.474	500
E	0.286	0.270	0.278	1000
F	0.169	0.165	0.167	2500
Unknown	0.520	0.507	0.513	379.5



14 VALORI ATTESI

Si consiglia ad ogni laboratorio di calcolare i propri valori di riferimento.

Gruppo		Intervallo (pg/mL)
Donne	Premenopausa	24-368
	Postmenopausa	10-181
Uomini		250-990

Non utilizzare i risultati ottenuti con questo dosaggio per formulare una diagnosi clinica. Infatti, soggetti esposti ad animali o a prodotti derivati da animali possono sviluppare anticorpi eterofili che interferiscono nel dosaggio. Ogni diagnosi clinica deve tenere conto di tutti i dati disponibili sul paziente; se si sospettano falsi risultati considerare le pregresse esposizioni ad animali o a prodotti derivati da animali.

15 PERFORMANCE**15.1 Sensibilità**

La dose minima rilevabile è stata calcolata per interpolazione sulla curva standard della media delle DO di 20 replicati dello standard A meno 2 SD. La sensibilità del kit Direct DHT ELISA è 7,23 pg/mL.

15.2 Specificità (Cross reattività)

Sono stati dosati i seguenti composti per verificare la loro cross reattività con l'anticorpo utilizzato nel kit Direct DHT ELISA. L'DHT ha una cross reazione del 100%.

Steroidi	Cross reattività %
Diidrotosterone	100
Testosterone	8.7
5 β diidrotosterone	2.0
Androstenedione	0.2

I seguenti steroidi hanno mostrato una cross reattività < 0.01%:

DHEAS, 17 β Estradiolo, Estriolo, Estrone, Progesterone, 17-OH Progesterone, Cortisolo e Pregnenolone.

15.3 Precisione intra-saggio

Tre campioni sono stati dosati 20 volte nello stesso esperimento con i seguenti risultati (espressi in pg/mL):

Campione	Media	SD	CV%
1	44.39	2.11	4.75
2	176.32	5.87	3.33
3	430.64	26.92	6.25

15.4 Precisione inter-saggio

Tre campioni sono stati dosati 10 volte durante 4 settimane con i seguenti risultati (espressi in pg/mL):

Campione	Media	SD	CV%
1	212.28	14.41	6.79
2	346.59	22.50	6.49
3	460.08	34.35	7.47

15.5 Recupero

A tre campioni di siero sono state aggiunte quantità definite di DHT; il dosaggio ha dato i seguenti risultati (espressi in pg/mL):

Campione	Osservato	Atteso	Recupero%
1 tal quale	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 tal quale	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 tal quale	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

15.6 Linearità

Tre campioni di siero sono stati diluiti con lo Standard A; il dosaggio ha dato i seguenti risultati (espressi in pg/mL):

Campione	Osservato	Atteso	Recupero%
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

15.7 Confronto fra metodi

Il kit DHT ELISA (A) è stato confrontato con un kit commerciale RIA in coated tube (B). I risultati sono riportati qui sotto:

Gruppo	N	Media Kit A	Media Kit B
Donne	10	95.5	99.0
Uomini	10	280.0	252.0

1 USO PROPUESTO

Inmunoensayo enzimático de *diagnóstico in-vitro* para la determinación cuantitativa de 5 α -Dihydrotestosterona en suero humano.

2 IMPLICACIONES CLÍNICAS

5 α -dihydrotestosterona (DHT) es un esteroide semejante a testosterona y androstendiona y forma parte de la clase de los llamados andrógenos. DHT es un esteroide de C19 y posee actividad andrógena. La gran parte de la producción andrógena tiene lugar principalmente en las células de Leydig de los testículos. Andrógenos circulan en el sangre, ligados a proteínas, sobre todo globulina ligadora de hormonas sexuales (SHBG), así como albumina. DHT tiene una afinidad ligadora a la SHBG tres veces más alta que testosterona. En hombres aproximadamente 70% de la DHT procede de la conversión periférica de testosterona, mientras que en mujeres la gran parte de la DHT procede de la androstendiona. El órgano principal para la neutralización de los andrógenos es el hígado. Por lo tanto las hormonas esteroides sufren modificaciones estructurales en el hígado que son generalmente consideradas como requisitos para su inactivación biológica. Algunos metabolitos son modificados, otros regresan primero a la circulación sanguínea antes de ser excretados. La eliminación de los esteroides del cuerpo se realiza por lo tanto mediante la secreción renal.

Tendencias Clínicas:

Pacientes con Síndrome de Klinefelter tienen niveles de DHT más bajos que personas sanas.

Aproximadamente 40% de todos los pacientes con hirsutismo y

30% de todos los pacientes con síndrome de ovario poliquístico (PCO) tienen un nivel de DHT elevado.

El nivel de DHT en jóvenes es más alto que en ancianos sanos. La producción de andrógenos aumenta durante la pubertad y da por resultado la formación de características masculinas. Es un hecho comprobado que los testículos humanos producen DHT en los tubos seminíferos. Por lo tanto en caso de heridas de los tubos seminíferos la producción de DHT es afectado también lo que resulta en niveles de plasma DHT más bajas (pacientes con aplasia germinal y azoospermia).

Asimismo se puede observar bajos niveles de plasma DHT en pacientes con anorquidia.

Además informaron que en algunos casos de cáncer de próstata (especialmente en fase D) la determinación de DHT puede ser útil en predecir la reacción a la terapia anti-andrógen.

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

El inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA) está basado en el principio de la competencia. Una cantidad desconocida de antígeno presente en la muestra y una cantidad fija de antígeno marcado enzimáticamente compiten por los sitios de unión de los anticuerpos que recubren los pozos. Tras la reacción del sustrato los pozos se lavan para detener la reacción de competencia. Después de la reacción del sustrato la intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de la muestra. Los resultados de las muestras se pueden determinar directamente usando la curva estándar.

4 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Sólo para uso en *diagnóstico in-vitro*. Sólo para uso profesional.
2. Antes de comenzar el ensayo lea las instrucciones completa y cuidadosamente. Use la versión válida del prospecto que se ofrece con el juego de reactivos. Asegúrese de entenderlo todo.
3. En caso de daño severo del estuche del juego de reactivos, contacte por favor a su suministrador en forma escrita antes de transcurrida una semana de la recepción. No utilice los componentes dañados en los ensayos pero guárdelos en forma segura para la reclamación.
4. Tome en cuenta el número de lote y la fecha de caducidad. No mezcle reactivos de diferentes lotes. No use reactivos vencidos.
5. Cumpla con las buenas prácticas de laboratorio y las pautas de seguridad. Use bata de laboratorio, guantes de látex desechables y gafas de protección cuando sea necesario.
6. Los reactivos de este juego que contienen materiales peligrosos pueden causar irritación ocular y cutánea. Vea MATERIAL SUMINISTRADO y las etiquetas para los detalles. Las Hojas de Datos de Seguridad de los materiales para este producto están disponibles o mediante solicitud directa.
7. Los reactivos químicos y los reactivos preparados o usados deben ser tratados como desechos peligrosos de acuerdo con las regulaciones nacionales sobre bioseguridad y pautas de seguridad.
8. El personal de limpieza debe ser capacitado por profesionales para el manejo de residuos peligrosos.
9. Evite el contacto con la solución de Parada. Puede causar irritaciones y quemaduras en la piel.
10. Todos los reactivos de este juego que contienen suero o plasma humano han sido ensayados y encontrados negativos para anti-HIV I/II, HBsAg and anti-HCV. Sin embargo, la presencia de estos u otros agentes infecciosos no puede ser excluida en forma absoluta, por lo que estos reactivos deben ser tratados como potencialmente biopeligrosos a los efectos de su manipulación y eliminación.

5 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El juego de reactivos es enviado a temperatura ambiente y debe ser almacenado a 2 - 8 °C. Manteniéndose alejado del calor o de la luz solar directa. El almacenamiento y estabilidad de muestras y reactivos preparados se detalla en los capítulos correspondientes. La placa de microtitulación es estable hasta la fecha de caducidad del juego de reactivos aún cuando la bolsa haya sido abierta, siempre que se vuelva a cerrar herméticamente y se almacene a 2 - 8 °C. Una vez abiertos los estándares y controles deben ser consumidos dentro de 14 días o almacenados alicuotado a -20 °C.

6 TOMA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Suero

Las precauciones habituales para venipuntura han de ser tenidas en cuenta. Es importante conservar la integridad química de un espécimen sanguíneo desde el momento de la obtención hasta que es analizado. No utilizar especímenes hemolíticos severos, ictericos o lipémicos severos. No utilizar especímenes que contengan NaN₃ o Timerosal ya que puedan llevar a resultados falsos. Las muestras que presenten turbidez deben ser centrifugadas antes del ensayo para eliminar cualquier partícula de materia.

Almacenamiento:	4 °C	≤ - 10 °C (Alícuotas)	Manténgase alejado del calor o de la luz solar directa. Evite congelar y descongelar repetidamente.
Estabilidad:	24 h	≥ 24 h	

7 MATERIALES SUMINISTRADOS

Cantidad	Símbolo	Componente
1 x 12 x 8	SORB MT	Placa de Microtitulación Tiras separables. Revestido con anticuerpo de conejo-anti-DHT (policlonal).
1 x 0,25 mL	ENZ CONJ 100x	Conjugado Enzimático, Concentrado (100 x) Contenido: DHT-HRP Conjugado, en solución buffer proteica, conservantes libre de mercurio.
1 x 2 mL	CAL	Estándar A; 0 pg/mL Listo para usar. Contenido: Dihidrotestosterona, en solución buffer proteica, conservantes libre de mercurio. Por concentraciones exactas el certificado Control de Calidad.
5 x 1,0 mL	CAL	Estándar B-F; 25; 100; 500; 1000; 2500 pg/mL Listo para usar. Contenido: Dihidrotestosterona, en solución buffer proteica, conservantes libre de mercurio. Por concentraciones exactas vea el certificado Control de Calidad.
1 x 1,0 mL	CONTROL high	Control Alto; Listo para usar. Contenido: DHT en solución buffer proteica, conservantes libre de mercurio. Por concentraciones exactas vea el certificado Control de Calidad.
1 x 1,0 mL	CONTROL low	Control Bajo; Listo para usar. Contenido: DHT en solución buffer proteica, conservantes libre de mercurio. Por concentraciones exactas vea el certificado Control de Calidad.
1 x 18 mL	SUB TMB	Solución de Substrato TMB, Listo para usar. Contenido: TMB y Peróxido de hidrógeno en una solución buffer libre de DMF o DMSO.
1 x 8 mL	STOP SOLN	Solución de Parada TMB Listo para usar. 1 N acidic solution.
2 x 50 mL	BUF WASH 10x	Solución Buffer de Lavado, Concentrado (10 x) Contenido: Solución buffer con detergente no-iónico y conservantes libre de mercurio.
1 x 17 mL	BUF	Buffer de Ensayo; Listo para usar. Contenido: solución buffer proteica, conservantes libre de mercurio.
1 x		Folio Adhesivo

8 MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas (Multipette Eppendorf o dispositivos similares, < 3% CV). Volúmenes: 50, 100, 150, 300 µL
2. Vortex
3. Micropipeta multicanal de 8 canales con reservorio de reactivo
4. Frasco lavador, sistema automatizado o semi-automatizado de lavado de placas de microtitulación
5. Fotómetro para placas de microtitulación capaz de leer absorbancias a 450 nm (longitud de onda de referencia 600-650 nm)
6. Agua bidestilada o desionizada
7. Toallas de papel, puntas para las micropipetas y cronómetro

9 INDICACIONES PARA EL PROCEDIMIENTO

1. Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificación del procedimiento de ensayo puede alterar los resultados. Los volúmenes a pipetear, los tiempos de incubación, las temperaturas y etapas de pretratamientos tienen que ser efectuados estrictamente siguiendo las instrucciones. Use sólo pipetas u otros dispositivos calibrados.
2. Una vez comenzado el ensayo, se deben completar todas las etapas sin interrupción. Asegúrese de que los reactivos, materiales y dispositivos necesarios estén listos en el momento adecuado. Permita que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente (18 °C - 25 °C) y agite suavemente por rotación cada vial de reactivo líquido o muestra antes del uso. Evite la formación de espuma.
3. Evite la contaminación de los reactivos, pipetas pocillos y/o tubos. Emplee una punta desechable nueva para cada reactivo, estándar o muestra. No intercambie las tapas. Tape siempre los viales que no estén en uso. No reutilice los pocillos, tubos o reactivos.
4. Algunos componentes contienen $\leq 250 \mu\text{L}$ de solución. Asegúrese de que toda la solución esté en el fondo del vial antes de abrirlo.
5. Se recomienda ensayar las muestras por duplicado para poder identificar errores potenciales de pipeteo.
6. Use un esquema de pipeteo apropiado según las dimensiones de la placa.
7. El tiempo de incubación afecta los resultados. Todos los pocillos deben ser manipulados en el mismo orden y secuencia de tiempo. Para el pipeteo de soluciones en los pocillos se recomienda una pipeta de 8 canales.
8. El lavado de la placa de microtitulación es un paso importante. Los pocillos insuficientemente lavados conllevan a resultados erróneos. Se recomienda emplear una pipeta multicanal o un sistema automático de lavado. No deje secar los pocillos entre incubaciones. Cuide de no dañar el recubrimiento de las placas durante el enjuague y/o la aspiración. Enjuague y agregue los reactivos cuidadosamente. Al enjuagar cerciórese que todos los pocillos estén completamente llenos con la Solución buffer de lavado y que no haya residuos en ellos.
9. La humedad afecta los pocillos y tubos recubiertos. No abra la bolsa hasta que alcance la temperatura ambiente. Los pocillos o tubos que no se empleen deben guardarse inmediatamente en la bolsa resellada con desecante.

10 INSTRUCCIONES PARA LA PREPARACIÓN DEL ENSAYO**Preparación de componentes liofilizados o concentrados**

Diluya / disuelva	Componente	con	Diluyente	Relación	Almacenamiento	Estabilidad
50 mL	BUF WASH 10x	450 mL	agua bidest.	1:10	2 - 8 °C	12 meses
120 μL	ENZ CONJ 100x	12 mL	BUF	1:101	Descargue todo que sobra.	

Las muestras que contienen concentraciones superiores al estándar más alto tienen que ser diluidas con Estándar A en relación de como máximo 1:8 y ensayado de nuevo. El resultado debe ser multiplicado con el factor de dilución.

11 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Pipetee **50 µL** de cada **Calibrador, Control y muestra** en cada pocillo respectivo de la Placa de Microtitulación.
2. Pipetee **100 µL** de **Conjugado Enzimático (1:101)** recién preparado en cada pocillo. Mezcle el contenido brevemente agitando cuidadosamente la placa por 10 segundos.
3. **Incube 1 h a TA (18 °C - 25 °C) sin agitador.**
4. Lave la placa **3 x** con **300 µL** de **Solución Buffer de Lavado** diluido. Remueva el exceso de solución golpeando cuidadosamente la placa invertida sobre una toalla de papel.
5. Para la adición de la Solución del Sustrato y de Paro utilice, de ser posible, una pipeta de 8 canales. La adición de sustrato y solución de paro debe llevarse a cabo en intervalos de tiempo iguales. Evite la formación de burbujas pipeteando con sobrevolumen.
6. Pipetee **150 µL** de **Solución de Substrato TMB** en cada pocillo. Mezcle el contenido brevemente agitando cuidadosamente la placa por 10 segundos.
7. **Incube 10 - 15 min a TA (18 °C - 25 °C) sin agitador** o hasta que el calibrador A alcance el color azul oscuro para la DO deseada.
8. Detenga la reacción del sustrato añadiendo **50 µL** de **Solución de Paro TMB** en cada pocillo. Mezcle el contenido brevemente agitando cuidadosamente la placa.
9. **Mida** la densidad óptica con un fotómetro a **450 nm*** dentro de **20 min.**

*) Si la DO excede el límite de detección superior o si un filtro de 450 nm no es disponible, se puede utilizar en lugar de eso un filtro de 405 o 415 nm. Las densidades ópticas estarán más bajas, pero eso no tiene efecto en los resultados de las muestras de paciente / de control.

12 CONTROL DE CALIDAD

Los resultados son válidos solamente si el ensayo ha sido realizado de acuerdo a las intrucciones. Además el usuario debe atenerse a las Prácticas de Buen Laboratorio (GLP) u otras normas o leyes comparables. Para la determinación del diagnóstico, el usuario y/o el laboratorio deben de tener un sistema validado de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP). Los valores de los controles del ensayo deben encontrarse dentro de los rangos de aceptación indicados en las etiquetas de los viales. Si este criterio no se cumple, el ensayo no es válido y debe repetirse. Cada laboratorio debe emplear muestras conocidas como controles adicionales. En caso de detectarse alguna desviación, se debe verificar lo siguiente: Fecha de vencimiento de los reactivos, condiciones de almacenamiento, pipetas, dispositivos, condiciones de incubación y método de lavado.

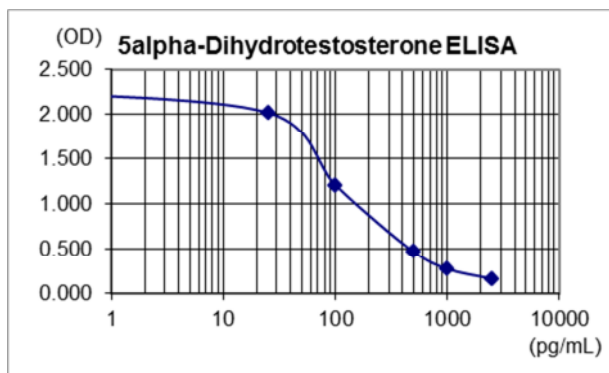
13 CÁLCULO DE RESULTADOS

La DO de los estándares (eje-y, lineal) se plotean contra su concentración (eje-x, logarítmico) ya sea en papel semi-logarítmico o empleando un método automático. Se logra un buen ajuste con cubic spline, 4 Parameter Logistics or Logit-Log. Para el cálculo de la curva estándar, use las mediciones obtenidas de los estándares (es aconsejable no emplear valores duplicados). La concentración de las muestras se puede leer directamente de la curva estándar. Las muestras que presenten una señal mayor a la del estándar mayor tienen que ser diluidas según se describe en INSTRUCCIONES PARA LA PREPARACIÓN DEL ENSAYO y analizadas nuevamente.

Curva de Calibración Típica

(Ejemplo. ¡No usar para el cálculo!)

Standard	DO ₁	DO ₂	OD _{Medio}	Valor (pg/mL)
A	2.285	2.273	2.279	0
B	2.025	2.019	2.022	25
C	1.211	1.212	1.212	100
D	0.468	0.479	0.474	500
E	0.286	0.270	0.278	1000
F	0.169	0.165	0.167	2500
Unknown	0.520	0.507	0.513	379.5



14 VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores normales.

Grupo		Intervalo (pg/mL)
Mujeres	Premenopausico	24-368
	postmenopausico	10-181
Hombres		250-990

Los resultados obtenidos con este kit nunca deben utilizarse como única base para un diagnóstico clínico. Por ejemplo, la presencia de anticuerpos heterofilicos en pacientes expuestos regularmente a los animales o productos de origen animal tiene un potencial causa de interferencias en los ensayos inmunológicos. Por consiguiente, para el diagnóstico debe incluirse todos los aspectos clínicos de pacientes con antecedentes a la exposición frecuente con animales / productos con sospechas a falsos resultados.

15 PRUEBAS FUNCIONALES

15.1 Sensibilidad analítica

El límite de detección inferior se calcula de la curva estándar mediante la determinación de la concentración resultante del medio de la DO del Estándar A (basado en 20 determinaciones duplicadas) menos 2 DS. La sensibilidad del juego de reactivos de 5 α Dihydrotestosterone ELISA da como resultado 7,23 pg/mL.

15.2 Especificidad (Reactividad cruzada)

Se han ensayado los siguientes compuestos químicos de su reactividad cruzada con el juego de reactivos 5 α Dihydrotestosterone ELISA con la Dihydrotestosterona teniendo una reactividad cruzada de 100%.

Esteroides	% Reactividad Cruzada
Dihydrotestosterona	100
Testosterona	8.7
5 β Dihydrotestosterona	2.0
Androstenedione	0.2

Los siguientes esteroides han sido ensayados, pero mostraron una reactividad cruzada de menos de 0.01%: Sulfato de Dehidroepiandrosterona, 17 β -Estradiol, Estriol, Estrona, Progesterona, 17-OH Progesterona, Cortisol y Pregnenolona.

15.3 Precision Intra-ensayo

Se han ensayado tres muestras cada una veinte veces con la misma curva estándar. Los resultados están presentados en la siguiente tabla (en pg/mL):

Muestra	Medio	DS	CV %
1	44.39	2.11	4.75
2	176.32	5.87	3.33
3	430.64	26.92	6.25

15.4 Precision Inter-ensayo

Se han ensayado tres muestras diez veces por un periodo de cuatro semanas. Los resultados están presentados en la siguiente tabla (en pg/mL):

Muestra	Medio	DS	CV %
1	212.28	14.41	6.79
2	346.59	22.50	6.49
3	460.08	34.35	7.47

15.5 RECUPERACION

Las muestras enriquecidas fueron producidas mediante el añadido de una cierta cantidad de DHT a tres muestras de suero de paciente. Los resultados están presentados en la siguiente tabla (en pg/mL):

Muestra	Resultado medido	Resultado esperado	Recuperacion %
1 Enriquecida	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 Enriquecida	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 Enriquecida	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

15.6 Linealidad

Se han diluido tres muestras de paciente con Estándar A. Los resultados están presentados en la siguiente tabla (en pg/mL):

Muestra	Resultado medido	Resultado esperado	Recuperacion %
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

15.7 Comparacion del metodo











El juego de reactivos 5 α Dihydrotestosterone ELISA (juego de reactivos A) fue comparado con un juego de reactivos RIA (Radio inmunoensayo) con tubos de vidrio (juego de reactivos B). Los resultados están presentados en la siguiente tabla (en pg/mL):

Grupo	N	Medio Juego de reactivos A	Medio Juego de reactivos B
Mujeres	10	95.5	99.0
Hombres	10	280.0	252.0

16 LITERATURE REFERENCES / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

1. Bassett, R.M., A simple chromatographic method for the radioimmunoassay of four androgenic steroids. *Medical Laboratory Sciences*, 37:31, 1980.
2. Baxendale, P.M., et al., Plasma and salivary androstenedione and dihydrotestosterone in women with hyperandrogenism. *Clinical Endocrinology*, 18:447, 1983.
3. Brooks, R.V., Androgens. *Physiology and Pathology*In: Makin, H.L. J., ed., *Biochemistry of Steroid Hormones*, 2nd ed., Oxford Blackwell Scientific Publications, 565:1984.
4. Cameron, E.H.D., In proceedings of the fifth tenovous workshop, *Steroid Immunoassay*, ed., Cameron, E.H.D., et al., Alpha Omega Publishing Cordiff, 1975.
5. Dunn, J.F., et al, Transport of Steroid Hormones: Binding of 21 endogenous steroids to both SHBG and CBG in human plasma. *J. Clin. Endocr. Metab.* 53:58, 1981.
6. Hammond, G.L., et al, The simultaneous radioimmunoassay of seven steroids in human spermat-ic and peripheral venous blood. *J. Clin. Endocr. Metab.* 45:16, 1977.
7. Ito, T., et al, Dihydrotestosterone in human peripheral plasma. *J. Clin. Endocr.* 31:362, 1970.
8. Mean, F., et al, Study of the binding of dihydrotestosterone, testosterone and oestradiol with sex hormone binding globulin. *Clinica Cemica Alta* 80:171, 1977.
9. Mooradian, A.D., et al, The biological actions of androgens. *Endocr. Rev.* 8:1-28, 1987.
10. Pazzagli, M., et al, Radioimmunoassay of plasma dihydrotestosterone in normal and hypogonadal men. *Clin. Endocr.* 82:380, 1976.
11. Wakelin, K., et al, Relationship of 5 β dihydrotestosterone and 5 α dihydrotestosterone to testos-terone in health and disease. *J. Endocrinol.* 87:450, 1980.
12. Wang, C., et al, Solitary androgens in hirsutism: Are they of use in routine evaluation. *Ann. Clin. Biochem.*23:590, 1986.
13. Kricka, L.J., Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin. Chemistry* 45:7, 1999.
14. Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. *Gynecol Obstet Invest* 40:139-140, 1995.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità