



DHT Elisa

KAPDB280



DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgium

Version: 230629

History

Summary of changes :

Previous Version :	New Version
220228	230629
Old DiaSource Logo	New DiaSource logo on the front page
INTENDED USE For the direct quantitative determination of Dihydrotestosterone by enzyme immunoassay in human serum. For <i>in vitro</i> use only.	INTENDED PURPOSE & USE Addition: This kit is intended for professional use only and is for laboratory use only. For <i>in vitro</i> 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.
	LIMITATIONS RELATED TO INTENDED PURPOSE & USE Addition of points 1 & 2: 1. This test is not intended to be used for screening purposes. 2. This test is not intended for home testing or self-testing.
	PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS Additional cautions and warnings added. Some previous limitations added to this section.
	QUALITY CONTROL New section added.
	PRECISION Reproducibility New section/data added.
	SENSITIVITY Addition of LoQ: "Limit of Quantitation (LoQ) was determined to be 17.0 pg/mL."



DHT Elisa

en

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

KAPDB280

IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

INTENDED 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.

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.

PRINCIPLE OF THE TEST

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

CLINICAL APPLICATIONS

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 tissue¹.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. This kit is for use by trained laboratory personnel (professional use only). For laboratory in vitro use only.
2. Practice good laboratory practices when handling kit reagents and specimens. This includes:
 - Do not pipette by mouth.
 - Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are handled.
 - Wear protective clothing and disposable gloves.
 - Wash hands thoroughly after performing the test.
 - Avoid contact with eyes; use safety glasses; in case of contact with eyes, flush eyes with water immediately and contact a doctor.
3. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
4. Do not use the kit beyond the expiry date stated on the label.
5. If the kit reagents are visibly damaged, do not use the test kit.
6. Do not use kit components from different kit lots within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
7. All kit reagents and specimens must be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of

specimens.

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

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

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

The calibrators and controls provided with the kit contain processed human serum/plasma that has been tested by approved methods and found to be

negative for the presence of HBsAg and antibodies to HCV, HIV 1/2 and HIV NAT. However, no test method can offer complete assurance that any viable pathogens are absent. Therefore, these components should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen, following good laboratory practices.

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.

SPECIMEN COLLECTION AND 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.

SPECIMEN PRETREATMENT

No specimen pre-treatment is necessary.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

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

REAGENTS PROVIDED

Anti-DHT Antibody Coated Microwell

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 at 2–8°C.

DHT-Horseradish Peroxidase (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 at 2–8°C.

Dihydrotestosterone Calibrators - Ready To Use. N = 0 to 6

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

* Listed below are approximate concentrations, please refer to bottle labels for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume/Vial
Calibrator 0	0 pg/mL	1.0 mL
Calibrator 1	25 pg/mL	1.0 mL
Calibrator 2	100 pg/mL	1.0 mL
Calibrator 3	250 pg/mL	1.0 mL
Calibrator 4	500 pg/mL	1.0 mL
Calibrator 5	1000 pg/mL	1.0 mL
Calibrator 6	2500 pg/mL	1.0 mL

Storage: 2–8°C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for four weeks at 2–8°C.

CONTROL

Controls - Ready To Use.

Contents: 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.

Refer to the QC certificate for the target values and acceptable ranges

Volume: 1.0 mL/vial

Storage: 2–8°C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for four weeks at 2–8°C.

WASH

SOLN

CONC

Wash Buffer Concentrate – X10

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 at 2–8°C.

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

Preparation of working wash buffer: To prepare the working wash buffer that is used for washing the microplate, dilute the wash buffer concentrate 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole microplate is to be used, dilute 50 mL of the wash buffer concentrate to 450 mL of deionized or distilled water.

CHROM

TMB

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 at 2–8°C.

STOP

SOLN

Stopping Solution - Ready To Use.

Contents: One bottle containing 1M sulfuric acid.

Volume: 8 mL/vial

Storage: 2–8°C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for four weeks at 2–8°C.

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment: None.

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

- After all kit components have reached room temperature, mix **gently** by inversion.
- Prepare** the working wash buffer (See the *Reagents Provided* section, wash buffer concentrate)
- Plan** the microplate wells to be used for calibrators, controls and samples. Remove the strips that will not be used from the microplate frame and place them in the bag with desiccant. Reseal the bag with the unused strips and return it to the refrigerator.
- Pipette** 50 µL of each calibrator, control and specimen sample into assigned wells.
- Pipette** 100 µL of the DHT-HRP conjugate into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
- 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**.
- Wash** the wells either with an automatic microplate washer (preferred) or manually as stated below :

Automatic: Using an automatic microplate washer, perform a **3-cycle** wash using **350 µL/well** of Wash Buffer Working Solution (3 x 350 µL). One cycle consists of aspirating all wells then filling each well with 350 µL of Wash Buffer Working Solution. After the final wash cycle, aspirate all wells and then tap the microplate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid.

Manually: For manual washing, perform a **3-cycle** wash using **350 µL/well** of Wash Buffer Working Solution (3 x 350 µL).

One cycle consists of aspirating all wells by briskly emptying the contents of the wells over a waste container, then pipetting 350 µL of Wash Buffer Working Solution into each well using a multi-channel pipette. After the final wash cycle, aspirate all wells by briskly emptying the contents over a waste container and then tap the microplate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid.

8. Pipette 150 µL of TMB Substrate into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).

9. Incubate the microplate at room temperature (no shaking) for **30 minutes**.

10. Pipette 50 µL of 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.

CALCULATIONS

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

QUALITY CONTROL

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

- The calibrator 0 mean optical density meets the acceptable range as stated in the QC Certificate.
- The calibrator with the highest concentration meets the % binding acceptable range as stated in the QC Certificate. % Binding = (OD of calibrator/OD of calibrator 0) x 100.
- The values obtained for the kit controls are within the acceptable ranges as stated in the QC certificate.
- The results of any external controls that were used meet the acceptable ranges.

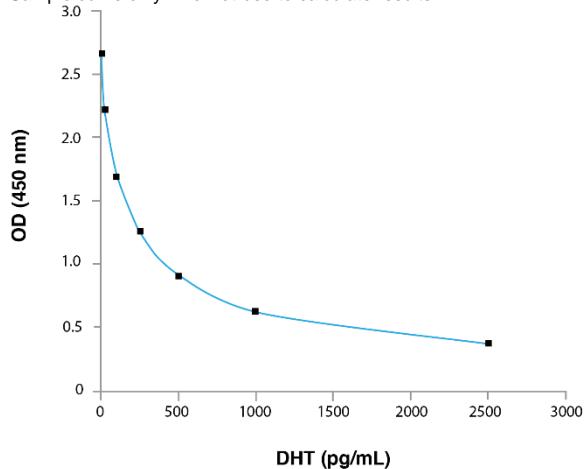
TYPICAL TABULATED DATA

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

Calibrator	Mean OD (450 nm)	% Binding	Value (pg/ml)
0	2.664	100	0
1	2.225	84	25
2	1.695	64	100
3	1.261	47	250
4	0.911	34	500
5	0.622	23	1000
6	0.372	14	2500
Unknown	1.077	-	353

TYPICAL CALIBRATION CURVE

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



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

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

Steroid	%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

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.

PRECISION

The precision study was performed according to the CLSI EP05-A2 guideline. 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	Within Run SD (pg/mL)	Within Run CV%	Between Run SD (pg/mL)	Between Run CV%	Total SD (pg/mL)	Total 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

RECOVERY

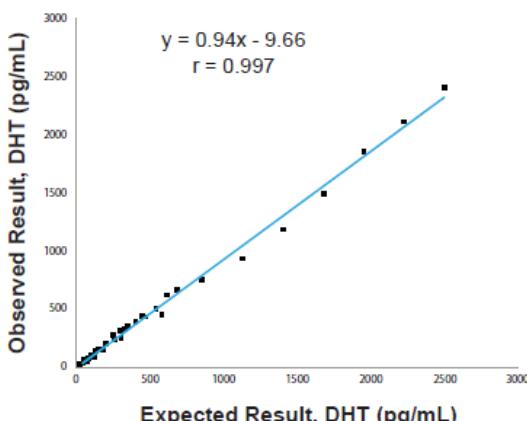
Spiked samples were prepared by adding defined amounts of DHT (present in serum samples with a high DHT concentration) to four patient serum samples. The results are tabulated below

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

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.



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

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.

Cohort	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

REFERENCES

- Marchetti P, Barth, JH (2013) Clinical Biochemistry of Dihydrotestosterone. *Annals of Clinical Biochemistry*, 50:95–107.
- 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.
- 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.
- Litman HJ. (2006) Serum Androgen Levels in Black, Hispanic, and White men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91:4326–4334.
- Bhattacharya 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.
- Greaves RF, et al. (2017). Harmonization of serum dihydrotestosterone analysis: establishment of an external quality assurance program. *Clin Chem Lab Med*. 55:522–529.
- Callum Fraser, Biological Variation: From Principles to Practice, AACC Press, 2013.
- 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
- E.J. Wickings; E. Nieschlag (1976) Stability of testosterone and androstenedione in blood and plasma samples. *Clin Chimica Acta*; 71:439–443.
- 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>
- 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.

**Other translations of this Instructions for Use can be downloaded
from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>**



Para la medición cuantitativa de la dihidrotestosterona (DHT) en suero humano mediante ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

KAPDB280

DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel.: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 90

INDICACIONES

Para la medición cuantitativa de la dihidrotestosterona (DHT) en suero humano mediante ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

Este kit es solo para uso profesional y solo para uso en laboratorio. Solo para uso diagnóstico *in vitro*. Diseñado para usarse de forma manual, pero puede adaptarse a analizadores abiertos y automatizados. El usuario es responsable de validar el rendimiento de este kit con cualquier analizador automatizado.

LIMITACIONES RELACIONADAS CON EL FIN Y EL USO

PREVISTOS

1. Esta prueba no está previsto que se use con fines de detección.
2. Esta prueba no está diseñada para pruebas caseras o de autoevaluación.
3. El kit está calibrado para la determinación de la DHT en suero humano. El kit no está calibrado para la determinación de DHT en otras muestras de origen humano o animal.
4. Los resultados obtenidos con este kit no deben utilizarse nunca como la única base para realizar un diagnóstico clínico o tomar decisiones terapéuticas.
5. Aunque se han evaluado sustancias que interfieren con frecuencia con esta prueba, otras sustancias que no se han evaluado, tienen el potencial de causar interferencias, como los medicamentos y la aparición de anticuerpos heterófilos en personas expuestas regularmente a animales o productos de origen animal.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El DHT ELISA es un inmunoensayo competitivo. La competición se produce entre la DHT presente en los calibradores, controles y muestras y un antígeno marcado con una enzima (conjugado con HRP) por un número limitado de lugares de unión de anticuerpos anti-DHT en los pocillos de la microplaca. Después del paso de lavado, que elimina los materiales no unidos, se añade el sustrato TMB (sustrato enzimático) que reacciona con la HRP para formar un producto de color azul que es inversamente proporcional a la cantidad de DHT presente. Después de una incubación, la reacción enzimática se detiene añadiendo solución de parada, lo que modifica el color azul en color amarillo. Un lector de placas de microvaloración medirá la absorbancia a 450 nm. Se utiliza un conjunto de calibradores para trazar una curva del calibrador en la que poder leer directamente la cantidad de DHT en las muestras y en los controles.

APLICACIONES CLÍNICAS

La dihidrotestosterona (DHT) es el andrógeno natural más activo en los seres humanos, con un papel principal en el desarrollo de los caracteres sexuales primarios y secundarios y una participación potencial en una infinidad de otros procesos fisiológicos. La mayor parte de la producción de andrógenos tiene lugar principalmente en las células de Leydig de los testículos. Los andrógenos circulan en la sangre unidos a proteínas, especialmente a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) procedente de la conversión periférica de la testosterona, mientras que en las mujeres la mayor parte de la DHT procede de la androstenediona.

Algunas de las principales indicaciones clínicas de la medición de DHT en suero son las investigaciones del retraso de la pubertad en los hombres y la evaluación de la presencia de tejido testicular activo¹.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Este kit es para uso por un profesional debidamente formado (solo para uso profesional).

Solo para uso *in vitro* en laboratorio.

2. Al manipular los reactivos y las muestras del kit emplee buenas prácticas de laboratorio.

Ello incluye:

- No pipeteo con la boca.
- No fume, beba o coma en las zonas donde se manipulan las muestras o los reactivos del kit.
- Lleve ropa protectora y guantes desechables.
- Lávese bien las manos después de realizar la prueba.
- Evite el contacto con los ojos; use gafas de seguridad; en caso de contacto con los ojos, enjuague los ojos inmediatamente con agua y consulte a un médico.
- 3. Los usuarios deben tener un conocimiento profundo del presente protocolo para que la utilización

de este kit sea eficaz. El rendimiento fiable solo se logrará mediante el cumplimiento estricto y cuidadoso de las instrucciones proporcionadas.

4. No utilice el kit si se ha superado la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
5. Si los reactivos del kit están visiblemente dañados, no utilice el kit de prueba.
6. No use componentes del kit de diferentes lotes de kits dentro de una prueba y no utilice ningún componente si se ha superado la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.
7. Todos los reactivos del kit y las muestras deberán estar a temperatura ambiente y mezclarse suavemente pero por completo antes de utilizar. Evitar congelar y descongelar las muestras reiteradamente.
8. Cuando se especifique utilizar agua para la dilución o reconstitución, use agua desionizada o destilada.
9. Inmediatamente después de su uso, cada componente individual del kit debe devolverse a la temperatura de almacenamiento recomendada que se indica en la etiqueta.
10. Debe establecerse una curva del calibrador para cada análisis.
11. Se recomienda a todos los clientes que准备n sus propios materiales de control o mezclas de plasma que deben incluirse en cada análisis a un nivel alto y bajo para evaluar la fiabilidad de los resultados.
12. Los controles (incluidos en el kit) deben incluirse en cada análisis y sus resultados deben estar dentro de los intervalos establecidos en el certificado de control de calidad; un resultado de control fallido puede indicar técnicas de procedimiento o pipeteo inadecuados, lavado incompleto o almacenamiento inadecuado de reactivos.
13. Al dispensar el sustrato y las soluciones de parada, no deben emplearse pipetas en las que estos líquidos entren en contacto con partes metálicas.
14. El sustrato TMB es fotosensible, debiendo permanecer incoloro si se conserva correctamente. La aparición de un color azul podría indicar inestabilidad o contaminación, en cuyo caso no debería utilizarse.
15. No utilice plasma muy hemolizado, muy lipémico, icterico o almacenado inadecuadamente.
16. Las muestras o controles que contengan azida o tiomersal no son compatibles con este kit, ya que pueden producir resultados falsos.
17. Los valores de las muestras superiores al intervalo de medición del kit deben notificarse como >2500 pg/ml. Si fuera necesaria una dilución y un análisis adicionales, solo podrán utilizarse muestras de suero con una concentración conocida de DHT baja (<50 pg/ml). El uso de cualquier otro reactivo puede producir resultados falsos.
18. Evite la contaminación microbiana de los reactivos.
19. Con objeto de evitar la contaminación de los reactivos, utilice una punta de pipeta desechable nueva para la dispensación de cada reactivo, muestra, calibrador y control.
20. Con objeto de evitar la contaminación de los reactivos, no vuelva a verter los reactivos en los recipientes originales.
21. Los reactivos del kit deben considerarse residuos peligrosos y desecharse de conformidad con la normativa local y/o nacional.
22. Los consumibles utilizados con el kit que son potencialmente biopeligrosos (por ejemplo, puntas de pipeta, frascos o recipientes que contienen materiales humanos) deben manipularse de conformidad con las prácticas de bioseguridad para minimizar el riesgo de infección y desecharse de conformidad con las normativas locales y/o nacionales relacionadas con los desechos biopeligrosos.
23. Este kit contiene 1 M de ácido sulfúrico en el componente de solución de parada. No combine ácido con residuos que contengan azida de sodio o hipoclorito de sodio.
24. Al manipular soluciones biopeligrosas o biocontaminadas, es muy recomendable el uso de gafas de seguridad y plástico desechable.
25. Es necesario realizar una calibración adecuada del equipo utilizado con la prueba, como las pipetas y el lector de microplacas de absorbancia.
26. Si fuera necesario el uso de un agitador de microplacas para el procedimiento de ensayo, el tipo y la velocidad del agitador se indican en la sección REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO, NO SUMINISTRADO. Tanto el tipo como la velocidad del agitador utilizado pueden influir en las densidades ópticas y en los resultados de las pruebas. Si se utiliza un tipo de agitador y/o velocidad diferente, el usuario será responsable de validar el rendimiento del kit.
27. No reutilice los pocillos de la microplaca, son para UN SOLO USO.
28. Para evitar condensación dentro de los pocillos de la microplaca en entornos húmedos, no abra la bolsa que contiene la microplaca hasta que alcance la temperatura ambiente.
29. Al leer la microplaca, la presencia de burbujas en los micropocillos afectará

a las densidades ópticas (DO). Elimine con cuidado las burbujas antes de realizar el paso de lectura.

30. Cualquier incidencia grave que se haya producido en relación con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

MATERIAL DE POTENCIAL RIESGO BIOLÓGICO

Los reactivos deben considerarse potencialmente biopeligrosos y deben manipularse con las mismas precauciones que se aplicarían a la muestra sanguínea. Todas las muestras humanas deben considerarse un riesgo biológico potencial y manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones y de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.

Los calibradores y controles suministrados con el kit contienen suero/plasma humano procesado analizados mediante métodos aprobados y que resultaron negativos para la presencia de HBsAg y a anticuerpos frente a VHC, VIH 1/2 y VIH NAT. Sin embargo, ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de ausencia de agentes patógenos viables. Por lo tanto, estos componentes deben considerarse potencialmente biopeligrosos y deben manipularse con las mismas precauciones que se aplicarían a cualquier muestra sanguínea, siga las Buenas Prácticas de Laboratorio.

RIESGOS QUÍMICOS

Evide el contacto directo con cualquiera de los reactivos del kit. Evide específicamente el contacto con el sustrato TMB (contiene tetrametilbencidina), la solución de parada (contiene ácido sulfúrico). Si se produce el contacto con alguno de estos reactivos, lávese con abundante agua y consulte la Ficha de datos de seguridad (FDS) para obtener información adicional.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se requiere aproximadamente 0,1 ml de suero por cada determinación por duplicado. Recaja 4-5 ml de sangre venosa en un tubo adecuadamente etiquetado y deje que coagule. Centrifugue a temperatura ambiente y transfiera cuidadosamente el suero a un nuevo tubo o recipiente de almacenamiento. Las muestras de suero pueden conservarse a temperatura ambiente hasta siete días, a 2-8 °C hasta catorce días o congelarse a una temperatura igual o inferior a -20 °C hasta un mes.

Considere todas las muestras humanas como materiales de posible riesgo biológico y tome las precauciones adecuadas cuando las manipule.

PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

No es necesario pretratar la muestra.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO NO SUMINISTRADO

1. Pipetas de un solo canal calibradas para dispensar 50 µl.
2. Pipetas multicanal calibradas para dispensar 50 µL, 100 µL y 150 µL.
3. Pipetas multicanal calibradas para dispensar 350 µL (si se lava manualmente).
4. Lavador automático de microplacas (recomendado).
5. Puntas de pipeta desechables.
6. Agua destilada o desionizada.
7. Lector de microplacas de absorbancia calibrado con un filtro de 450 nm y un límite superior de DO de 3,0 o superior.

REACTIVOS PROPORCIONADOS

Microppla recubierta de anticuerpos anti-DHT

Lista para usar.

Contenido: Una microplaca de 96 pocillos (12x8) recubierta con anticuerpo polyclonal anti-DHT cada una en una bolsa resellable con desecante.

Conservación: 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Después de la apertura: Estable durante cuatro semanas a 2-8 °C.

Conjugado de DHT-peroxidasa de rábano picante (HRP)

Lista para usar.

Contenido: un frasco que contiene conjugado con DHT con peroxidasa de rábano picante en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.

Volumen: 15 ml/frasco

Conservación: 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Después de la apertura: Estable durante cuatro semanas a 2-8 °C.

Calibradores de dihidrotestosterona - Listos para usar.

N = 0 a 6

Contenido: Siete botellas de calibrador que contienen concentraciones específicas de DHT. Matriz de base de suero humano con un conservante sin mercurio. Preparadas añadiendo matriz con cantidades definidas de DHT.

* A continuación se indican concentraciones aproximadas, consulte en las etiquetas de los frascos las concentraciones exactas.

Calibrador	Concentración	Volumen/Vial
Calibrador 0	0 pg/ml	1,0 ml
Calibrador 1	25 pg/ml	1,0 ml
Calibrador 2	100 pg/ml	1,0 ml
Calibrador 3	250 pg/ml	1,0 ml
Calibrador 4	500 pg/ml	1,0 ml
Calibrador 5	1000 pg/ml	1,0 ml
Calibrador 6	2500 pg/ml	1,0 ml

Conservación: 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Después de la apertura: Estable durante cuatro semanas a 2-8 °C.



Controles - Listos para usar.

Contenido: Dos frascos de control que contienen diferentes concentraciones de DHT. Matriz de base de suero humano con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo matriz con cantidades definidas de DHT.

Consulte en el certificado de control de calidad los valores objetivo y los intervalos aceptables

Volumen: 1,0 ml/vial

Conservación: 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Después de la apertura: Estable durante cuatro semanas a 2-8 °C.

Tampón de lavado concentrado -

Contenido: un frasco que contiene tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.

Volumen: 50 ml/frasco

Conservación: 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Despues de la apertura: Estable durante cuatro semanas a 2-8 °C.

Después de la preparación: El tampón de lavado de trabajo es estable durante 2 semanas después de la preparación, siempre que se respeten las Buenas Prácticas de Laboratorio. Para evitar el crecimiento microbiano, prepare la solución de trabajo del tampón de lavado en un recipiente limpio y guárdelo refrigerado (2-8 °C) cuando no esté en uso.

Preparación del tampón de lavado de trabajo: Para preparar el tampón de lavado de trabajo que se utiliza para lavar la microplaca, diluya el concentrado de tampón de lavado 1:10 en agua destilada o desionizada antes de utilizarlo. Si se va a utilizar la microplaca completa, diluir 50 ml del tampón de lavado concentrado en 450 ml de agua desionizada.

Sustrato de TMB - Listo para usar.

Contenido: un frasco que contiene tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón que no contenga DMF ni DMSO.

Volumen: 16 ml/frasco

Conservación: 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Despues de la apertura: Estable durante cuatro semanas a 2-8 °C.

Solución de parada - Lista para usar.

Contenido: un frasco con ácido sulfúrico 1 M.

Volumen: 8 ml/vial

Conservación: 2-8 °C

Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

Despues de la apertura: Estable durante cuatro semanas a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Pretratamiento de las muestras: Ninguno.

Todos los componentes del kit, los controles y las muestras deben alcanzar la temperatura ambiente antes de su uso. Los calibradores, los controles y las muestras humanas deben analizarse por duplicado. Una vez que se haya iniciado al procedimiento, deben completarse todos los pasos sin interrupción.

1. Después de que todos los componentes del kit hayan alcanzado la temperatura ambiente, mezcle **suavemente** por inversión.

2. Prepare el tampón de lavado de trabajo (véase la sección **Reactivos suministrados** concentrado de tampón de lavado)

1. Planifique cuántos pocillos de la microplaca se utilizarán para los calibradores, controles y muestras.

Retire las tiras que no se vayan a utilizar del marco de la microplaca y colóquelas en la bolsa con desecante. Vuelva a sellar la bolsa con las tiras sin usar y devuélvala al frigorífico.

4. **Pipetee 50 µl** de cada calibrador, control y muestra en los pocillos asignados.
5. **Pipetee 100 µl** del conjugado con DHT-HRP en cada pocillo (se recomienda el uso de una pipeta multicanal).
6. De golpecitos suaves el marco de la microplaca durante 10 segundos para mezclar el contenido de los pocillos e **incube** la microplaca a temperatura ambiente (sin agitar) durante **90 minutos**.
7. **Lave** los pocillos de la microplaca con un lavador de microplacas automático (preferido) o manualmente, como se indica a continuación:

Automático: Con un lavador automático de microplacas, realice un lavado de **3 ciclos** con **350 µl/pocillo** de solución de trabajo de tampón de lavado (3 x 350 µl). Un ciclo consiste en aspirar todos los pocillos y después llenar cada pocillo con 350 µL de solución de trabajo de tampón de lavado. Después del ciclo de lavado final, aspire todos los pocillos y a continuación dé golpecitos con firmeza a la microplaca contra papel absorbente para eliminar cualquier líquido residual.

Manualmente: Para el lavado manual, realice un lavado de **3 ciclos** con **350 µl/pocillo** de solución de trabajo de tampón de lavado (3 x 350 µl).

Un ciclo consiste en aspirar todos los pocillos vaciando energéticamente el contenido de los pocillos sobre un recipiente de residuos y, a continuación, pipeteando 350 µl de solución de trabajo de tampón de lavado en cada pocillo con una pipeta multicanal. Despues del último ciclo de lavado, aspire todos los pocillos vaciando rápidamente el contenido sobre un recipiente de residuos y a continuación dé golpecitos con firmeza a la microplaca contra papel absorbente para eliminar cualquier líquido residual.

8. **Pipetee 150 µl** de sustrato TMB en cada pocillo (se recomienda el uso de una pipeta multicanal).

9. **Incube** la microplaca a temperatura ambiente (sin agitar) durante **30 minutos**.

10. **Pipetee 50 µl** de solución de parada en cada pocillo (se recomienda el uso de una pipeta multicanal) en el mismo orden y velocidad que utilizó para la adición del sustrato TMB. Dé golpecitos suavemente en el marco de la microplaca para mezclar el contenido de los pocillos.

11. **Mida** la densidad óptica (absorbancia) en los pocillos de la microplaca utilizando un lector de absorbancia de microplacas ajustado a 450 nm, en los 20 minutos siguientes a la adición de la solución de parada.

CÁLCULOS

1. Calcule la densidad óptica media de cada calibrador, control y muestra.
2. Utilice un ajuste de curva de 4 o 5 parámetros con software de inmunoensayo para generar una curva de calibrador.
3. El software de inmunoensayo calculará las concentraciones de los controles y las muestras utilizando los valores medios de densidad óptica y la curva del calibrador.
4. Si una lectura de alguna muestra es superior a 2500 pg/ml y es necesario diluirla y volver a analizarla, dilúyala con una muestra de suero con una concentración conocida de DHT baja (<50 pg/ml) de no más de 1:10. El resultado obtenido debe multiplicarse por el factor de dilución.

CONTROL DE CALIDAD

Al evaluar la validez de los resultados de la prueba, se deben evaluar los siguientes criterios:

1. La densidad óptica media del calibrador 0 cumple con el intervalo aceptable como se indica en el Certificado de control de calidad.
2. El calibrador con la concentración más alta cumple con el rango aceptable de unión porcentual como se indica en el Certificado de control de calidad. Unión porcentual = (OD del calibrador/OD del calibrador 0) x 100.
3. Los valores obtenidos para los controles del kit están dentro de los intervalos aceptables como se indica en el certificado de control de calidad.
4. Los resultados de los controles externos que se usaron cumplen con los intervalos aceptables.

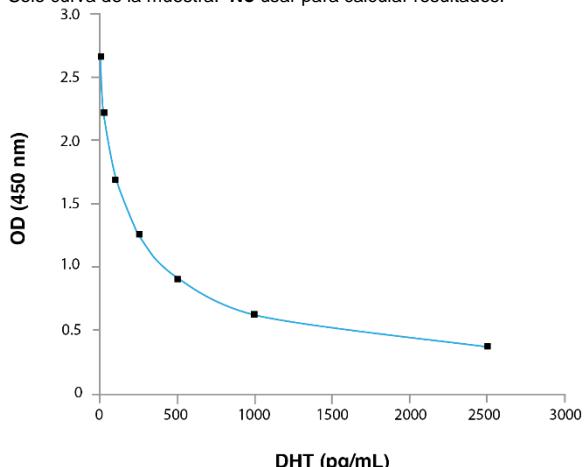
DATOS TÍPICOS TABULADOS

Solo datos de muestra. **No** usar para calcular resultados.

Calibrador	DO media (450 nm)	Unión porcentual	Valor (pg/ml)
0	2,664	100	0
1	2,225	84	25
2	1,695	64	100
3	1,261	47	250
4	0,911	34	500
5	0,622	23	1000
6	0,372	14	2500
Desconocido	1,077	-	353

CURVA TÍPICA DE CALIBRACIÓN

Solo curva de la muestra. **No** usar para calcular resultados.



EFICACIA DIAGNÓSTICA

SENSIBILIDAD

El estudio de sensibilidad analítica se realizó según la directriz CLSI EP17-A2. Se realizaron sesenta réplicas de la matriz y de las muestras de baja concentración en pruebas independientes con tres lotes del kit. Se determinó que el Límite de Fondo (LF) era de 9,4 pg/ml, el Límite de Detección (LD) era de 17,0 pg/ml y el Límite de Cuantificación (LC) era de 17,0 pg/ml.

ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Se evaluó la reactividad cruzada de los siguientes compuestos con DHT, siendo la reactividad cruzada del 100 %.

Esteroides	% Reactividad cruzada
5α-DHT	100
17-hidroepiandrosterona	<0,01
17β-estradiol	<0,01
Aldosterona	<0,01
Androstendiona	0,6
Corticosterona	<0,01
Cortisol	<0,01
Danazol	<0,01
DHEAS	<0,01
Estriol	<0,01
Estrona	<0,01
Etisterona	0,03
Pregnenolona	<0,01
Progesterona	<0,01
Testosterona	8,1

INTERFERENCIAS

Se realizó un estudio de interferencias según la directriz CLSI EP07-A2. No se observaron interferencias importantes en las concentraciones de hasta 10 g/l de Hemoglobina, 10 mg/dl de Bilirrubina (conjugada y no conjugada), 1500 mg/dl de Triglicéridos, 2,4 µg/ml de Biotina, 1,2 µg/ml de HAMAS y 2531 UI/ml de Factor Reumatoide.

Se observaron interferencias tanto para la bilirrubina conjugada como para la no conjugada a niveles de 20 mg/dl o superiores.

PRECISIÓN

Los estudios de precisión se realizaron según la directriz CLSI EP05-A2. El protocolo experimental utilizó un diseño anidado de componentes de la varianza con 7 muestras de suero, 10 días de pruebas, dos lotes y dos científicos por día. Cada científico realizó dos pruebas al día y dos mediciones repetidas por serie (un diseño de $10 \times 2 \times 2 \times 2$) para cada muestra. Los resultados se analizaron con un ANOVA bidireccional anidado y se resumen en la siguiente tabla

Muestra	Media	DE dentro de la misma serie (pg/ml)	%CV dentro de la misma serie	DE dentro de distintas series (pg/ml)	%CV dentro de distintas series	DE total (pg/ml)	%CV total
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

* Se espera que las muestras que están cerca del límite de cuantificación tengan una mayor imprecisión. El error total permitido para muestras inferiores a 145 pg/ml es de ± 30 pg/ml⁶

REPRODUCIBILIDAD

El estudio de reproducibilidad evaluó el rendimiento de precisión del dispositivo siguiendo el modelo de diseño experimental $3 \times 5 \times 5$ (tres ubicaciones x cinco días de prueba x cinco réplicas por día) en laboratorios situados en Italia, EE. UU. y Canadá. Los resultados se analizaron con un ANOVA bidireccional anidado y se resumen en la siguiente tabla.

Muestra	Media (pg/ml)	Repetibilidad		Dentro de la ubicación		Reproducibilidad	
		DE (pg/ml)	%CV	DE (pg/ml)	%CV	DE (pg/ml)	%CV
CCI	129,4	5,5	4,3	6,5	5,1	7,5	5,8
CCS	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

RECUPERACIÓN

Las muestras enriquecidas se prepararon añadiendo cantidades definidas de DHT (presente en muestras de suero con una concentración elevada de DHT) a cuatro muestras de suero de pacientes. Los resultados se tabulan a continuación.

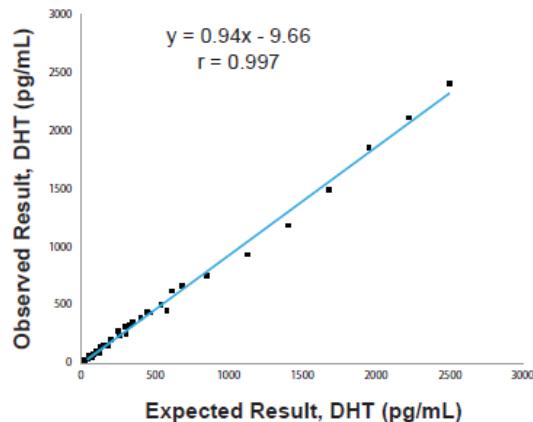
Muestra	Resultados de concentración (pg/ml)	Concentración de muestras añadidas (pg/ml)	Concentración prevista a partir de 9:1 v/v (pg/ml)	Recuperación %
1	91,3	-	-	-
	177,3	800	162,2	109,3
	230,2	1472	229,4	100,3
	313,8	2672	349,4	89,8
2	191,6	-	-	-
	261,0	800	252,5	103,4
	306,2	1472	319,7	95,8
	408,0	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

LINEALIDAD

El estudio de linealidad se realizó según la directriz CLSI EP06-Ed2 utilizando cuatro muestras de suero humano que cubrían el intervalo del ensayo (entre 226 y 2500 pg/ml).

Las muestras se diluyeron en muestras de suero con una concentración baja de DHT (inferior a 50 pg/ml) en varios niveles de concentración equidistantes y hasta el diez por ciento (1:10), se analizaron por duplicado y los resultados se

compararon con la concentración prevista. El análisis estadístico muestra que el ensayo es suficientemente lineal hasta una dilución de 1:10.



ESTUDIOS COMPARATIVOS

El kit DHT ELISA (y) se comparó con un método DHT de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem (x). La comparación de 90 muestras de suero arrojó los siguientes resultados de regresión lineal utilizando un ajuste Passing-Bablok:

$$y = 0,78x + 73,8, r = 0,88.$$

INTERVALOS DE REFERENCIA

Los intervalos de referencia (95 %) se estimaron utilizando muestras obtenidas de individuos adultos de diversas razas. Cada laboratorio establecerá su propio intervalo de valores de referencia. ND = No detectable; Inferior al LD.

Cohorte	n	Mediana (pg/ml)	Intervalo de confianza del 95 % (ng/ml)
Hombres adultos (20–89 años)	304	380	143 – 842
Mujeres adultas (18–50 años)	183	91	ND – 596
Mujeres adultas (51–83 años)	135	53	ND – 431

Los intervalos de referencia se estimaron utilizando muestras pediátricas como se muestra a continuación. Debido al tamaño limitado de la muestra, no se pudo establecer un intervalo de referencia del 95 %, se proporciona el intervalo total. Cada laboratorio establecerá su propio intervalo de valores de referencia.

Sexo	Edad (años):	n	Intervalo total (pg/ml)
Hombre	1–9	40	ND – 85,7
	10–14	26	11,1 – 875,6
	15–18	14	70,3 – 1260,9
Mujer	2–9	40	ND – 88,9
	10–14	21	22,5 – 280,6
	15–18	19	62,6 – 760,3

REFERENCIAS

- Marchetti P, Barth, JH (2013) Clinical Biochemistry of Dihydrotestosterone. *Annals of Clinical Biochemistry*, 50:95–107.
- 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.
- Arabnezhad MR et al. (2020), Anti-androgenic effect of 6-formylindole[3,2-b]carbazole (FICZ) in LNCaP cells is mediated by the aryl hydrocarbon-androgen receptors cross-talk, *Steroids*, 153:108508.
- Litman HJ. (2006) Serum Androgen Levels in Black, Hispanic, and White men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91:4326–4334.
- Bhattacharya 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.

Fecha de revisión: 29/06/2023

**Otras traducciones de estas instrucciones de uso
disponibles para su descarga en nuestra página web:
<https://www.diasource-diagnostics.com/>**