



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

Hirsutismo: manifestaciones clínicas y estudios hormonales

**Trabajo de Titulación para optar al título de Licenciada en
Laboratorio Clínico**

Autora:

Chávez Bustán Esthefanía Alejandra

Tutora:

Mgs. Eliana Elizabeth Martínez Durán

Riobamba, Ecuador. 2024

DECLARATORIA DE AUTORÍA

Yo, **Esthefania Alejandra Chávez Bustán**, con cédula de ciudadanía **0604762229**, autora del trabajo de investigación titulado: **Hirsutismo: manifestaciones clínicas y estudios hormonales**, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de mí exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor (a) de la obra referida, será de mi entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 22 de noviembre de 2024.



Esthefania Alejandra Chávez Bustán

C.I: 0604762229

DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR

Quien suscribe, **Eliana Elizabeth Martínez Durán** catedrático adscrito a la Facultad de Ciencias de la Salud, por medio del presente documento certifico haber asesorado y revisado el desarrollo del trabajo de investigación titulado: **Hirsutismo: manifestaciones clínicas y estudios hormonales**, bajo la autoría de **Esthefania Alejandra Chávez Bustán**; por lo que se autoriza ejecutar los trámites legales para su sustentación.

Es todo cuanto informar en honor a la verdad; en Riobamba, a los **22** días del mes de **noviembre** de 2024.



Mgs. Eliana Elizabeth Martínez Durán

C.I: 1714480827



CERTIFICACIÓN

Que, **Chávez Bustán Esthefanía Alejandra** con CC: **0604762229**, estudiante de la Carrera de **Laboratorio Clínico**, Facultad de **Ciencias de la Salud**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado "**Hirsutismo: manifestaciones clínicas y estudios hormonales**", cumple con el **2 %**, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **TURNITIN**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 23 de octubre de 2024

Mgs. Eliana Elizabeth Martínez Durán
TUTORA

CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación **Hirsutismo: manifestaciones clínicas y estudios hormonales**, presentado por **Esthefania Alejandra Chávez Bustán**, con cédula de identidad **0604762229**, bajo la tutoría de **Mgs. Eliana Elizabeth Martínez Durán**; certificamos que recomendamos la **APROBACIÓN** de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba el **22 de noviembre de 2024**.

Mgs. Ximena del Rocío Robalino Flores
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE GRADO



MsC. Yisela Carolina Ramos Campi
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



Mgs. Carlos Iván Peñafiel Méndez
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO



DEDICATORIA

A Dios por bendecirme en todo momento, permitiendo tenerme junto a mis seres que más amo en mi vida y hacer realidad mis sueños.

A mis amados padres Edison Chávez y Sandra Bustán, por su amor, sacrificio, porque estuvieron conmigo siempre siendo mi motivación y fortaleza, para cumplir con mis objetivos anhelados.

A mi hijo Santiago y esposo Jhonny que nunca me dejaron sola, a mis hermanos que siempre se preocuparon y cuidaron de mí, ayudándome a recorrer todo este trascurso de tiempo que ahora se cumple por y para ustedes.

Esthefania Alejandra Chávez Bustán

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de Chimborazo por abrirme sus puertas para cumplir mis metas con ayuda de excelentes profesionales.

A mi padre Edison Chávez y mi madre Sandra Bustán, quienes me inculcaron valores, demostrándome todos los días con mucho amor, paciencia, acompañándome en todo mi proceso formativo, enseñándome a ser responsable, educada, todo gracias a sus esfuerzos brindados, siendo su ejemplo y una excelente profesional en un futuro.

A mis amores, mi hijo Santiago y esposo Jhonny, quienes son mi inspiración ya que estuvieron conmigo en las buenas y malas acompañándome, motivándome, consintiendo para salir adelante y nunca rendirme.

A mi hermano Cristian y Valentina Chávez, quienes me motivaron y acompañaron durante mi formación profesional con cada halago de superación.

Esthefania Alejandra Chávez Bustán

ÍNDICE GENERAL:

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	17
Etiología.....	17
Fisiopatología.....	17
Epidemiología.....	18
Indicaciones al paciente.....	21
PRUEBAS DE LABORATORIO.....	22
Testosterona total.....	22
Testosterona libre.....	23
Globulina portadora de hormona sexual – SHBG.....	24
17 OH Progesterona.....	25
HORMONAS ALTERADAS.....	21
Androstenediona.....	27
Sulfato de deshidroepiandrosterona DHEA-S.....	28
Hormona folículo estimulante.....	29
Hormona luteinizante LH.....	30
Estradiol.....	31
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	33
Enfoque de la investigación.....	33
Tipo de investigación.....	33
Población y muestra.....	34
Criterios de inclusión y exclusión.....	35
Métodos de análisis.....	35
Técnicas y procedimientos.....	35
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	49
Anexos	59

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Manifestaciones clínicas con signos y síntomas según la edad en presencia de hirsutismo.	39
Tabla 2. Patologías con valores hormonales alterados causantes de hirsutismo de acuerdo a la edad.....	42
Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de las pruebas hormonales para el diagnóstico de hirsutismo.	45

RESUMEN

El hirsutismo es una alteración hormonal que se caracteriza por presentar crecimiento excesivo del vello corporal en mujeres, presentándose en zonas como, barbilla, cuello, tórax, área inferior o superior del ombligo, glúteos, articulaciones, abdomen, patillas, labio superior, espalda, cara inferior y anterior de los muslos, debido a la gran producción androgénica y ciertos fármacos. Esta investigación se realizó en base a revisión bibliográfica donde se evaluó sus manifestaciones clínicas y estudios hormonales para su diagnóstico. Fue un estudio cualitativo con un tipo de investigación descriptivo, documental no experimental, se trabajó con un corte transversal, tipo retrospectivo. Se revisaron 75 artículos científicos, seleccionados fueron 23 mediante los criterios de inclusión y exclusión. Los datos obtenidos fueron investigados en diferentes bases informativas confiables como; Scielo, PubMed, Lilacs, Elsevier, Google Académico. El muestreo que se aplicó fue no probabilístico. El análisis en los resultados y discusión en base a diversos autores se logró cumplir con los objetivos planteados, evidenciando que las manifestaciones clínicas con mayor prevalencia es hiperandrogenismo con un 40%, patologías como el síndrome de ovario poliquístico con hormonas alteradas: testosterona $1,09 \pm 1,10$ ng/dL, LH $6,1 \pm 4,6$ mUI/mL, FSH $15,5 \pm 14,8$ mUI/mL, con una sensibilidad 80-95% y especificidad 60-80%, donde se concluyó que su manifestación clínica principal es hiperandrogenismo, presentándose en mujeres con síndrome de ovario poliquístico alterando las hormonas como 17 OH Progesterona, SHBG, DHEAS, estradiol con 80-90% sensibilidad, androstenediona, testosterona, LH y FSH con una especificidad de 50-80%, esto significa que es importante para descartar la patología presente posterior a estudios hormonales evidenciados.

Palabras Claves: hirsutismo, andrógenos, síndrome de ovario poliquístico, trastornos endocrinos, testosterona.

ABSTRACT

Hirsutism is a hormonal disorder characterized by excessive body hair growth in women. This growth typically occurs in the chin, neck, chest, lower and upper navel areas, buttocks, joints, abdomen, sideburns, upper lip, back, lower face, and anterior thighs. The condition is often due to elevated androgen levels and may be influenced by certain medications. This research was conducted through a literature review to evaluate the clinical manifestations and hormonal studies relevant to its diagnosis. The study was qualitative and descriptive, employing a non-experimental documentary approach with a cross-sectional, retrospective design. Seventy-five scientific articles were reviewed, and 23 were selected based on specified inclusion and exclusion criteria. The data were sourced from various reliable databases, including Scielo, PubMed, Lilacs, Elsevier, and Google Scholar. A non-probabilistic sampling method was applied. The analysis of the results and discussions among various authors fulfilled the study's objectives. The findings indicated that hyperandrogenism was the most prevalent clinical manifestation, observed in 40% of cases. Conditions such as polycystic ovary syndrome were noted to alter hormone levels, with reported values including testosterone at 1.09 ± 1.10 ng/dL, LH at 6.1 ± 4.6 mIU/mL, and FSH at 15.5 ± 14.8 mIU/mL. The sensitivity of these hormonal changes ranged from 80-95%, while specificity varied from 60-80%. In conclusion, hyperandrogenism is the primary clinical manifestation of hirsutism in women with polycystic ovary syndrome. Hormonal studies revealed alterations in levels of 17 OH Progesterone, SHBG, DHEAS, and estradiol, with sensitivities of 80-90%. Testosterone, androstenedione, LH, and FSH also exhibited specificities ranging from 50-80%. This underscores the importance of conducting hormonal studies to rule out underlying pathologies.

Keywords: hirsutism, androgens, polycystic ovary syndrome, endocrine disorders, testosterone.

Reviewed by:



Lic. Raquel Verónica Abarca Sánchez. Msc.

ENGLISH PROFESSOR

c.c. 0606183804

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El vello corporal no es considerado aceptable según diferentes estándares globales, en belleza y cultura. En todos los países se cree que el vello facial no es atractivo para las mujeres. Como resultado, padecen una mayor presión psicológica para cumplir con las expectativas sociales de apariencia y estética¹. Algunas causas incluyen la hiperproducción de andrógenos, ya sean por origen ovárico o suprarrenal, glucocorticosteroides, progestinas, antagonistas de estrógenos, donde se asocia a un problema de salud, el cual puede afectar a toda la población a nivel mundial¹.

Esta patología fue descrita por primera vez en 1923 cuando Clémentine Delait, también conocida como la “mujer barbuda Plombières-les-Bains” en Francia, presentó un crecimiento excesivo por vello en un patrón similar a los hombres. Desde entonces, se ha investigado y comprendido mejor, se ha relacionado varios factores hormonales, como el alto nivel de andrógenos, síndrome de ovario poliquístico (SOP) o la hiperplasia suprarrenal congénita⁸.

Está relacionado con varios factores, entre ellos se encuentran el origen étnico, donde se ha observado que es la ascendencia mediterránea, del Oriente Medio y sur de Asia son más propensas a presentar un mayor crecimiento de vello corporal sin una causa identificable. Además, la obesidad puede contribuir esta afección, ya que el exceso de peso puede aumentar la producción de andrógenos. Por último, desequilibrios hormonales, como el SOP, ya que los ovarios producen niveles más altos en los andrógenos de lo normal⁸.

En la adolescencia, entendida tal como la define la Organización Mundial de la Salud (OMS), como el período comprendido entre los 12 y 24 años en un 10% afectados por esta patología los cuales refleja importantes problemas para el diagnóstico². Esta se convierte en una condición que afecta al sexo femenino en América del Norte, alrededor del 40-60%, es la principal manifestación del hiperandrogenismo con más de 20.000 mil mujeres en edad reproductiva, con enfermedades como el síndrome de ovario poliquístico, siendo evaluadas por estudios hormonales con resultados de alteraciones de 15.000 mil mujeres con una prevalencia del 65-75%³⁻⁵.

Este trastorno endocrino es más común en los Estados Unidos, en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica en agosto el 2022 en la que se evaluaron a 8.000 mil mujeres generando resultados de 4.000 mil de ellas padecen de la enfermedad, por ende, se indica que la prevalencia del hirsutismo varía del 10% al 50% entre la población femenina. Además, un metaanálisis en datos publicados por la edición de junio 2022 Human Reproductive una clínica de fertilidad que se encuentra situada en Chicago, el estado norteamericano se encontró 3.000 mujeres que indican tener diabetes tipo 1 con presencia de SOP con una prevalencia de 26%, hiperandrogenemia 29%, hirsutismo 24% y oligomenorrea 14%⁵⁻¹⁵.

La Ley Orgánica de Salud del Ecuador dispone en el Art. 32: “La salud es un derecho que garantiza el estado, cuya relación se vincula al ejercicio de otros derechos entre ellos el derecho al agua, alimentación, educación, cultura física, trabajo, seguridad social, ambientes sanos y otros que sustenten el buen vivir²⁴.”

En Ecuador más del 5-10 % tendrán SOP, alrededor del 10% hirsutismo idiopático y el resto tendrá trastornos fármacos con un 80%, que incluyen hiperplasia suprarrenal congénita no clásica, hiperandrogenismo con resistencia a la insulina y acantosis nigricans, pero se estima un problema clínico frecuente que afecta en edad reproductiva, Maroto A, dice que es caracterizado por el aumento de vello corporal terminal con un patrón masculino, en áreas corporales con dependencia androgénica⁶⁻⁷.

Es caracterizada por el crecimiento abundante de vello no deseado en partes del cuerpo como en la cara, pecho, espalda, parte inferior del abdomen, parte superior de los brazos o piernas, virilización, con signos y síntomas como cambios en la voz, desarrollo muscular excesivo, hipertrofia del clítoris y desfeminización con involución del desarrollo mamario, acné, aumento grasoso en el cabello o seborrea. Es importante destacar que puede tener diferentes grados de expresión y percepción, lo que se considera excesivo puede variar en diferentes personas⁸⁻²¹.

Por otro lado, se espera que la elevada carga en esta patología aumente la demanda debido a productos por depilación y opciones en tratamiento, la provincia de Tungurahua 800 de cada 1.000 mil mujeres analizadas en un intervalo de 95% no lo consideran como una patología, por lo que, acuden a especialistas en depilación al instante, sin revisión específica por

estudios hormonales para su respectivo tratamiento, ya que algunos estudios han abordado la relación que tiene con el SOP en el que se ha diagnosticado de las 1.000 a 600 mujeres con esta afección.

En la provincia de Chimborazo se reportó un caso de hirsutismo el cual fue derivado a la ciudad de Ambato, lugar donde se le realizó una depilación médica láser, método utilizado para corregir de forma eficaz y comprobada, la foliculitis, hirsutismo, hipertrichosis, que alteran el aparato pilosebáceo que produce la presencia de vello no deseado afectando a un porcentaje significativo, la población femenina teniendo una prevalencia del 8% en edad reproductiva, con una repercusión estética en algunos casos, esta puede variar según la población y el método utilizado, se estima que entre un 5% y 10% en edad reproductiva pueden presentar algún grado de la enfermedad⁶⁻⁹.

Esta investigación tiene como principales beneficiarios a todas las mujeres, al padecer esta patología, ya que un diagnóstico preciso se diferencia por la caracterización clínica permitiendo identificar las causas subyacentes del trastorno, como desequilibrios hormonales, herencia genética, obesidad y fármacos, esto es fundamental para determinar el enfoque para el diagnóstico más adecuado y personalizado para cada mujer.

Los datos aportan en gran medida al impacto teórico ya descrito en otras literaturas debido a que los nuevos resultados que se obtengan podrían ayudar a comprender mejor las manifestaciones clínicas, etiología, fisiopatología y diagnóstico²⁵. Esto podría conducir a la definición por nuevos conceptos y a la mejora de los tratamientos disponibles. Además, el diagnóstico temprano puede ayudar a prevenir complicaciones y abordar posibles condiciones médicas asociadas. También permite brindar el apoyo y la orientación necesaria para que puedan mejorar los síntomas de manera efectiva en su calidad de vida⁵.

¿Cómo se diagnostica el hirsutismo tomando en cuenta las manifestaciones clínicas y estudios hormonales en mujeres?

Los valores hormonales que conforman al desarrollo de hirsutismo es debido a la aparición de bastante vello por problemas hormonales, cuando no tiene un control adecuado desde un inicio, es decir es importante conocer si los valores hormonales han aumentado o han

disminuido, cuando es diagnosticada con esta patología, presenta un diagnóstico prescrito por un médico endocrinólogo, ginecólogo o médico tratante, debido que así se le conocerá si es efectivo el tratamiento o es necesario el cambiar los medicamentos⁸⁻²⁶.

Entre los diferentes métodos diagnósticos existentes para conocer si una paciente presenta un desarrollo, tanto en estadios tempranos o avanzados junto a sus manifestaciones clínicas, donde se encuentra el examen físico, evidenciando vello en ciertas zonas del cuerpo donde no es característico, exámenes del laboratorio, mismo que se puede evidenciar alteraciones hormonales y también el aumento o disminución en ciertos valores hormonales⁹⁻²⁷.

El presente trabajo de investigación tiene como finalidad evaluar las manifestaciones clínicas y estudios hormonales en mujeres con hirsutismo mediante datos bibliográficos confiables para un correcto diagnóstico.

- Distinguir las manifestaciones clínicas según la edad a través de una revisión sistemática de literatura científica para comprender los signos y síntomas presentes en las alteraciones hormonales con presencia de hirsutismo.
- Destacar patologías con valores hormonales alterados de acuerdo a la edad a través de bibliografía científica especializada para la detección de hirsutismo.
- Interpretar pruebas de laboratorio hormonales junto a la sensibilidad y especificidad a través de evidencia científica que respalden su efectividad en la determinación de la importancia de estas pruebas en el diagnóstico de hirsutismo.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

HIRSUTISMO

Es un trastorno dermatológico por el crecimiento descontrolado de vello, puede ser a la vez benigno y desagradable, la buena apariencia se asocia con excelentes puntuaciones cognitivas, habilidades sociales superiores y buenos modales⁸. Por lo que es definido como un exceso de vello corporal en áreas que se observan comúnmente en mujeres con implantes androgénicos, incluida el área supra labial, mentón, orejas, pecho, abdomen, espalda, nalga, parte interna y frontal en muslos, afecta a mujeres desde temprana edad presentando manifestaciones clínicas diferentes⁹.

Etiología

El patrón metabólico en los andrógenos en las mujeres determina la causa, por su mayor producción androgénica debido a procesos del metabolismo, ováricos y suprarrenales que intervienen a diferentes hormonas¹⁰. Sin embargo, al presentar trastornos suprarrenales, síndrome de Cushing e hiperplasia suprarrenal congénita en edad adulta, los tumores en los ovario y suprarrenales productores andrógenos también provocan una producción en el aumento en niveles androgénicos libres debido a la disminución en la globulina transportadora de hormonas sexuales¹¹.

Fisiopatología

El hirsutismo es una condición dermatológica caracterizada por una interacción compleja entre los niveles circulantes de andrógenos y la sensibilidad de los folículos pilosos a estas hormonas. Específicamente, la testosterona puede ser convertida en la piel a dihidrotestosterona (DHT), un andrógeno más potente, mediante la acción de la enzima 5alfa-reductasa. Esta enzima se presenta en dos variantes isoenzimáticas, situadas en los cromosomas 5 y 2, respectivamente, las cuales están activas tanto en la piel como en el folículo piloso¹³.

Además, los folículos y las glándulas sebáceas poseen receptores específicos para los andrógenos, lo que amplifica su respuesta. En ausencia de fuentes externas de andrógenos, el hirsutismo puede deberse ya sea a una producción excesiva de estas hormonas por los ovarios o las glándulas suprarrenales, o a una mayor sensibilidad de la piel a los niveles normales de andrógenos circulantes¹³⁻⁴².

Epidemiología

La prevalencia del síndrome de ovario poliquístico (SOP) en distintas poblaciones femeninas varía considerablemente según cómo se define la población y los fenotipos del trastorno evaluados en los estudios epidemiológicos. Los datos indican que hasta el 35% de las mujeres con amenorrea secundaria pueden padecer SOP, mientras que este porcentaje asciende entre 80 y 90% en aquellas que sufren de oligomenorrea. Además, aproximadamente el 75% de las mujeres que buscan asistencia médica por infertilidad debido a anovulación se ven afectadas por este síndrome. Por otro lado, el SOP también se detecta en el 25% de las mujeres que no presentan síntomas, pero tienen antecedentes familiares de la condición¹⁴.

Manifestaciones clínicas

En las mujeres la presencia de abundante vello corporal con apariencia áspera y oscuro principalmente en la cara, pecho, abdomen, parte interna muslos y espalda. Considerando que los niveles altos en los andrógenos causan esta patología, con el tiempo pueden aparecer otros síntomas llamados virilización¹⁵.

Virilización pueden incluir:

- Engrosamiento de la voz
- Atrofia uterina
- Acné
- Reducción del tamaño de los senos
- Aumento de la masa muscular

- Agrandamiento del clítoris¹⁵.

Hiperandrogenismo

El exceso de producción androgénica, que incluye tanto testosterona total como testosterona libre, puede manifestarse clínicamente de diversas maneras. Los síntomas más comunes incluyen la aparición de acné y seborrea, así como irregularidades en el ciclo menstrual. Aunque menos frecuentes, pueden incluir alopecia androgénica, alteraciones en la voz y en el comportamiento sexual, sudoración excesiva y cambios físicos como clitoromegalia y un aumento del volumen de los labios mayores¹⁶⁻²⁰.

Hipertrichosis

El aumento del vello tipo lanugo largo, que se presenta en abundante cantidad de forma grueso y áspero que generalmente no sigue un patrón de distribución masculino, puede ser influenciado tanto por factores genéticos y raciales como por el uso de ciertos medicamentos. Este tipo se observa en áreas como los antebrazos y las piernas. Sin embargo, también puede presentarse, aunque con menos frecuencia, en la cara, muslos y el tronco¹²⁻¹⁷.

Idiopático o familiar

El aumento de la sensibilidad cutánea a los andrógenos puede deberse a diversos factores, uno de ellos es la mayor actividad de una enzima conocida como 5-alfa-reductasa en la piel. Esta enzima es clave en la conversión de la testosterona en dihidrotestosterona (DHT), un andrógeno más potente y activo a nivel de los folículos pilosos. Además, ciertas predisposiciones familiares pueden contribuir a una mayor densidad por unidad de área en la piel, lo que también puede intensificar la respuesta androgénica¹⁰⁻⁴¹.

Hiperplasia suprarrenal congénita

Está ocasionada por falta de enzimas necesarias para la síntesis en cortisol y aldosterona, lo que provoca aumentar la hormona adrenocorticotrópica ACTH, que estimula la producción en andrógenos²⁸. En este síndrome se presenta virilización y aceleración en edad ósea, y el diagnóstico diferencial se realiza determinando los niveles y después estimular con 1-24 ACTH la concentración de 17-hidroxiprogesterona sérica¹⁸. El compromiso enzimático en la hiperplasia suprarrenal congénita está dado en un 95% por 21 alfa hidroxilasa y 10 % por la 11 beta hidroxilasa²².

Virilización

Se debe a un cuadro con más gravedad por hiperandrogenismo, acompañado en el aumento por engrosamiento en la voz, musculatura, alopecia, clitoromegalía, aumento de libido y disminución en el tamaño de los senos (desfeminización)¹⁹⁻²⁴.

Síndrome del Ovario Poliquístico

Comienza desde la pubertad, desconociendo con precisión el motivo de la causa, la hormona Luteinizante es elevada en proporción a la hormona Folículo estimulante, provocando necesidad para el desarrollo en los folículos ováricos, llevando a anovulación crónica con folículos inmaduros y una producción aumentada por andrógenos²⁰⁻²³.

Diagnóstico según Ferriman Gallwey

En su evaluación el estándar es la puntuación Ferriman Gallwey. Incluyendo 9 partes del cuerpo clasificadas sobre 11: mentón, pecho, espalda superior e inferior, labio superior, abdomen superior e inferior, brazos, antebrazos, pantorrillas y muslos. Si no hay pelo terminal en la zona examinada se puntúa³²:

1. Si es el más pequeño.
2. Más del mínimo, pero no equivalente a un varón adulto.
3. Se adapta a un varón adulto.
4. Similar a un varón adulto sano y viril³².

Puntuación:

Leve: 0-15

Moderado: 16-25,

Grave: más de 25 puntos (la puntuación más alta es 36 puntos) Anexo 1.

Indicaciones al paciente

Indicaciones previas antes de la toma:

- Un día antes cenar comida blanda sin carnes rojas, grasas o pesadas.
- No realizar actividad física como ir al gimnasio, correr, desvelarse, estresarse, tener ansiedad, debido a que es un examen hormonal muy especial y sus concentraciones pueden variar.
- Ayuno mínimo 8 horas y máximo 10 horas.
- No beber, fumar o consumir sustancias.
- Antes reposar 20 minutos, para su posterior toma sanguínea.

HORMONAS ALTERADAS

Alteración Testosterona

Es una hormona femenina y masculina, la cual actúa como andrógeno, por lo que, en las mujeres es un precursor obligatorio la biosíntesis del estradiol³³. En el hirsutismo se debe al exceso hormonal masculino como andrógenos, principalmente la testosterona, presentando efectos fisiológicos tanto en tejidos reproductivos y no reproductivos femeninos. Esta hormona es producida en los ovarios y las glándulas suprarrenales³⁴.

Al ser un andrógeno por su mayor importancia en el diagnóstico, por lo que en esta hormona existen alteraciones en crecimiento exceso de vello, presentándose por diferentes maneras oscuras en diferentes zonas en las que actúan los andrógenos como en la cara, pubis, cuello, tórax³⁵.

PRUEBAS DE LABORATORIO

Exámenes hormonales principales:

Testosterona total

Cuando se detectan niveles elevados de testosterona, que exceden significativamente los rangos normales de 0,2 a 0,95 ng/mL, es crucial investigar posibles alteraciones en las glándulas suprarrenales, así como en los ovarios. Un nivel de testosterona total superior a 1,5 ng/mL indicativo de condiciones como el hiperandrogenismo o la presencia de tumores que secretan andrógenos. Estas condiciones requieren una evaluación médica detallada para determinar la causa subyacente asegurando un tratamiento adecuado y oportuno para manejar los síntomas previniendo complicaciones⁴⁵.

Principio

La medición de la testosterona se lleva a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático competitivo. En este tipo de ensayo, se establece una competencia entre el antígeno presente en la muestra y un antígeno conjugado con una enzima, ambos buscando unirse a un anticuerpo biotinilado que está fijado en los pocillos de la placa del ensayo. Durante el proceso de lavado, se eliminan los antígenos que no lograron unirse a los anticuerpos. La señal generada por la actividad enzimática de los antígenos unidos es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno original en la muestra⁴⁵. Anexo 2

Muestra y volumen: Suero 1 ml mínimo

Conservación: Temperatura Ambiente: 48 Horas, Refrigerado: 2 a 8 °C (15 Días), Congelado: -20 °C (1 año)

Técnica: Inmunoensayo competitivo de enzima

Valores:

- 0,2 - 0,95 ng/mL⁴⁵.

Testosterona libre

La medición de la testosterona libre es una herramienta diagnóstica importante, especialmente cuando se trata de evaluar hiperandrogenemia, aunque no se considera un examen de rutina, representa una fracción de la testosterona total en el cuerpo, no está ligada a proteínas y es biológicamente activa, lo que hace más sensible para detectar desequilibrios hormonales. Las concentraciones normales de testosterona libre oscilan entre 0 y 3 ng/mL. En situaciones donde los síntomas sugieren un exceso de andrógenos, puede proporcionar un reflejo más preciso del estado hormonal, ofreciendo así un complemento valioso a las mediciones de testosterona total⁴⁶.

Principio

El ensayo inmunoenzimático competitivo es un método preciso utilizado para medir concentraciones de diversas sustancias, incluyendo hormonas como la testosterona. En este tipo de ensayo, se produce una competencia entre el antígeno presente en la muestra y un antígeno conjugado a una enzima, ambos compitiendo por unirse a un número limitado de sitios en un anticuerpo que está inmovilizado en la superficie de un pocillo, siendo inversamente proporcional a la cantidad de antígeno.⁴⁶. Anexo 3

Muestra y volumen: Suero 1 ml mínimo

Conservación: Temperatura Ambiente: 48 Horas, Refrigerado: 2 a 8 °C (15 Días), Congelado: -20 °C (1 año)

Técnica: Inmunoensayo enzimático competitivo

Valores:

- 0 – 3 ng/mL⁴⁶.

Globulina portadora de hormona sexual – SHBG

Es una proteína producida en el hígado, por lo que su función es unirse a las hormonas sexuales en la sangre. Al hacerlo, se encarga del control y la cantidad de hormonas sexuales que están activas en el organismo, cuando adhiere a las hormonas sexuales, los tejidos no pueden utilizar esas hormonas. Se encargan de regular la cantidad de testosterona disponible para los tejidos y puede afectar los síntomas relacionados con la testosterona⁴⁷.

Principio

La prueba basada en el método de sándwich de un solo paso siendo una técnica avanzada utilizada principalmente para la detección de globulina portadora de hormonas sexuales (SHBG) en una muestra. En esta metodología, la muestra se mezcla con micropartículas recubiertas con anticuerpos anti-SHBG y con anticuerpos anti-SHBG vinculados a enzimas. Durante la fase de incubación, el SHBG presente en la muestra reacciona con ambos tipos de anticuerpos, formando un "sándwich" entre las micropartículas y los anticuerpos enzimáticos.

La intensidad de la luz emitida durante esta reacción, medida en unidades de luz relativa (RLU), es directamente proporcional a la concentración de SHBG en la muestra. Esta medición permite una evaluación precisa de los niveles de SHBG, que es crucial para el estudio y manejo de diversas condiciones hormonales⁴⁷. Anexo 4

Muestra y volumen: Suero 1 ml

Conservación: Refrigerado: 2 a 8 °C (7 Días), Congelado: -20 °C (2 meses)

Técnica: Quimioluminiscencia - CLIA

Valores:

- Mujeres de 17-65 años 24-110,07 nmol/L
- Fase posmenopáusica 13,25-74,11 nmol/L⁴⁷.

17 OH Progesterona

Es un análisis importante utilizado generalmente para apartar condiciones como la hiperplasia suprarrenal congénita, una afección atribuida a la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa. Este test es especialmente recomendado para personas que presentan síntomas o signos que sugieren esta patología o el síndrome de ovario poliquístico (SOP). Realizar la prueba durante la fase folicular temprana del ciclo menstrual es crucial para obtener resultados más precisos, ya que es el momento en que los niveles hormonales son más representativos para evaluar estas condiciones⁴⁸.

Principio

La prueba mediante un ensayo inmunoenzimático competitivo se realiza de la siguiente manera: se inicia combinando en el pocillo un anticuerpo biotinilado que está inmovilizado, con dos formas de antígeno, uno presente en la muestra de estudio y otro que forma parte de un conjugado enzimático. Esta configuración crea una competencia entre los antígenos por unirse a un número limitado de sitios disponibles en el anticuerpo⁴⁸.

Durante el proceso de decantación, se elimina cualquier antígeno que no haya logrado unirse a los anticuerpos, dejando solo los complejos antígeno-anticuerpo en el pocillo. La

clave del ensayo es que la actividad enzimática detectada al final del proceso es inversamente proporcional a la concentración de la muestra. Esto significa que cuanto más concentración de antígeno haya en la muestra, menor será la señal enzimática detectada. Este resultado inverso permite calcular con precisión la concentración del antígeno en la muestra, proporcionando información valiosa para el diagnóstico o monitoreo de diversas condiciones médicas⁴⁸. Anexo 5

Muestra y volumen: Suero 1 ml

Conservación: Refrigerado: 2 a 8 °C (7 Días), - 20 °C (congelarse solo una vez)

Técnica: Inmunoensayo enzimático competitivo

Valores:

Fase ovulatoria

- Fase folicular 0,20 – 1,30 ng/mL
- Fase lútea 1,0 – 4,51 ng/mL
- Posmenopáusica 0,2 – 0,9 ng/mL⁴⁸.

Alteración Hormona Androstenediona

Es un esteroide masculino que se produce mayoritariamente por las glándulas suprarrenales, también pueden ser producidas por las gónadas. Su determinación es importante, ovarios poliquísticos y tratamiento de los portadores defectos hidroxilasa. Por lo que se presenta elevación en etapas tardías, la transición menopáusica a comparación con la testosterona, al no generar variabilidad en los resultados se puede realizar la determinación en un solo tipo de ensayo³⁶⁻³⁷.

En el sexo femenino la androstenediona se transforma en estrógenos y los valores aumentados se presentan al alterarse por abundancia de vello oscuro con apariencia de sexo masculino diagnosticado como hirsutismo³⁸.

Androstenediona

Es uno de los principales precursores de la testosterona, sintetizada en la glándula suprarrenal. Se utiliza como un indicador en actividad androgénica, debido a que la hormona esteroide es uno de los importantes andrógenos, además testosterona y dehidroepiandrosterona son producidos por las células de Leydig de los testículos, hasta cierto punto también en la corteza suprarrenal. En el sexo femenino, los andrógenos se producen en las glándulas suprarrenales y ovarios, es decir diagnosticadas con esta patología⁴⁹.

Principio

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico antígeno donde la muestra compete con la androstenediona antigénica marcada con peroxidasa de rábano HRP, Conjugado por la unión al anticuerpo anti androstenediona adsorbido en la microplaca. Posterior la incubación, separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado en la fase sólida. Finalmente, al reaccionar con el sustrato peroxidasa de rábano y sustrato TMB, la enzima peroxidasa de rábano presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción H₂SO₄. El color es intenso y desarrollado es inversamente proporcional a la concentración androstenediona en la muestra⁴⁹. Anexo 6

Tipo de muestra: Suero 1 mL mínimo

Conservación: Refrigerado: 2 a 8 °C (5 Días).

Técnica: Inmunoensayo enzimático colorimétrico

Valores:

- Fase folicular 0,75-3,1 ng/mL
- Fase lútea 0,94-3,2 ng/mL⁴⁹.

Sulfato de deshidroepiandrosterona DHEA-S

Prueba útil para el diagnóstico en el caso por virilización, por otro lado, esta es crucial para los carcinomas adrenocorticales, ya que sus valores serán elevados, tomando en cuenta que resultados normales oscilan de 0,03 a 5,88 $\mu\text{g/mL}$ ⁵⁰.

Principio

El ensayo inmunoenzimático competitivo es un método utilizado para determinar la presencia de un antígeno específico. Este procedimiento comienza con la preparación de un pocillo donde se fija un anticuerpo biotinilado. Simultáneamente, se introduce tanto el antígeno de interés adherido a un conjugado enzimático como el antígeno de la muestra en estudio. Estos competirán por vincularse a los sitios limitados disponibles en el anticuerpo. Tras esta fase de competencia, se lleva a cabo una etapa de decantación para eliminar los antígenos que no lograron unirse, siendo inversamente proporcional a la concentración de la muestra⁵⁰. Anexo 7

Muestra y volumen: Suero 1 ml

Conservación: Refrigerado: 2 a 8 °C (2 Días), - 20 °C (2 Meses) Congelar una vez

Técnica: Inmunoensayo enzimático competitivo

Valores:

- 0,03 – 5,88 $\mu\text{g/mL}$ ⁵⁰.

Exámenes secundarios:

Alteración Hormona Folículo Estimulante

La hormona FSH se encarga del desarrollo y maduración de folículos ováricos promoviendo la respecta maduración en los óvulos, se considera que esta actúa en las células granulosas de los ovarios, así estimulando la esteroidogénesis³⁹.

Hormona folículo estimulante

A pesar de que actualmente esta hormona no forma parte de los criterios formales para el diagnóstico, su medición sigue siendo relevante y se utiliza como un indicador que puede orientar hacia el diagnóstico definitivo. Esta práctica es común en estudios clínicos y exámenes rutinarios para evaluar la función hormonal y proporcionar información valiosa sobre el estado de salud⁵³.

Principio

Para determinar la concentración de la hormona FSH en el suero, método de ensayo en fase solida de tipo sándwich directo. Este involucra las muestras diluidas con el conjugado anti-FSH-HRP que se añaden a los pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal de FSH subunidad beta, la muestra se une a un anticuerpo monoclonal anti-FSH, otro anticuerpo y anti-FSH se une a la hormona, estas proteínas no unidas con el conjugado HRP, siendo lavados con su solución, tras el sustrato, su color intenso es directamente proporcional a la concentración de FSH en la muestra⁵⁴. Anexo 8

Muestra y volumen: Suero 1 ml

Conservación: Refrigerado: 2 a 8 °C (14 Días), - 20 °C (6 Meses) Congelar solo una vez

Técnica: Inmunoensayo

Valores:

- Fase lútea folicular 2,0 – 10 mUI/mL
- Medio ciclo 2,0 – 20 mUI/mL
- Posmenopáusica >15 mUI/mL⁵⁴.

Alteración Hormona luteinizante

Esta hormona fomenta la secreción de esteroides sexuales, lo que permite la maduración y la proliferación. Se sabe también que estimula la síntesis por andrógenos en las células teca, lo que provoca la luteinización de las células granulosas y la síntesis de progesterona⁴⁰.

Hormona luteinizante LH

En esta prueba las concentraciones hormonales son esenciales para determinar si una paciente puede estar exhibiendo condiciones como el síndrome de ovario poliquístico (SOP), hiperandrogenismo, o incluso desarrollar hiperinsulinemia debido a causas patológicas diversas. Estos niveles varían significativamente a lo largo de las diferentes fases del ciclo ovulatorio de la mujer.

Principio

Se utiliza un ensayo inmunoenzimométrico del tipo sándwich. Este método involucra la combinación de un anticuerpo monoclonal biotinilado, un anticuerpo marcado con enzima, y el antígeno objetivo del suero. Estos componentes interactúan formando un complejo sándwich, sin competencia entre los elementos, asegurando una vinculación efectiva. Tras un periodo de incubación, se procede a decantar la mezcla para eliminar cualquier antígeno no adherido. La fase final del ensayo mide la actividad enzimática asociada al anticuerpo, la cual refleja directamente proporcional a la concentración de la muestra. Este tipo de ensayo es altamente preciso y es utilizado frecuentemente en diagnósticos clínicos⁵⁵. Anexo 9

Muestra y volumen: Suero 1 ml

Conservación: Refrigerado: 2 a 8 °C (14 días), Congelado: -20 °C (6 meses)

Técnica: Ensayo Inmunoenzimométrico

Valores:

- Fase folicular 0,5 – 10,5 mUI/mL
- Ciclo menstrual 18,4 – 61,2 mUI/mL
- Fase lútea 0,5 – 10,5 mUI/mL
- Posmenopáusica 8,2 – 40,8 mUI/m⁵⁵.

Estradiol

Esta prueba, que se realiza bajo el control de las hormonas gonadotrópicas FSH y LH, es crucial para evaluar la función ovárica, problemas menstruales y la fertilidad. El estradiol, producido en los ovarios, juega un papel vital en estas evaluaciones. Se ha observado que el estradiol tiende a estar elevado en todas las fases de la maduración folicular en mujeres que muestran niveles altos de andrógenos y presentan síntomas de hirsutismo⁵³.

Principio

Para medir la concentración de un antígeno en una muestra, se emplea un ensayo inmunoenzimático competitivo. Este método inicia mezclando un anticuerpo marcado con biotina y el antígeno de interés presente en la muestra. Después de un breve período de incubación, se introduce una enzima que competirá con el antígeno de la muestra por los sitios de unión disponibles en el anticuerpo. Una vez completada esta competencia, se realiza una decantación para eliminar cualquier antígeno que no se haya unido. La actividad enzimática que permanece unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del antígeno en la muestra⁵⁶. Anexo 10

Muestra y volumen: Suero 1 mL

Conservación: Temperatura Ambiente: 12 horas Refrigerado: 2 a 8 °C (2 Días), - 20 °C (6 Meses) Congelar una vez

Técnica: Inmunoensayo enzimático competitivo

Valores:

- Fase folicular 9 – 175 pg/ml
- Fase lútea 44 – 195 pg/ml
- Preovulatoria 107 – 281 pg/ml
- Menopáusicas 42 - 289 pg/ml⁵⁶.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

Enfoque de la investigación

El presente trabajo tuvo un enfoque cualitativo debido a que se recopiló información de diferentes fuentes bibliográficas como artículos y documentos en base de datos científicos relacionadas al tema, siendo seleccionada y analizada de bibliografía relevante y vigente, sin fundarse en la estadística ni datos numéricos.

Tipo de investigación

El presente trabajo de investigación se desarrolló a partir de los siguientes criterios metodológicos.

Según el nivel

Fue de nivel descriptivo ya que se procedió con el análisis y descripción de información relevante y actualizada incluida en diferentes bases de datos científicas que tuvieron relación, la cual se detalló las manifestaciones clínicas y estudios hormonales en mujeres con Hirsutismo.

Según el diseño

Se presentó un diseño documental no experimental, debido a que la investigación se basó en la revisión en literaturas científicas en fuentes confiables ya existentes en artículos y en las diferentes bases de datos, que permitieron obtener la importancia de la investigación, además no se manipularán las variables simplemente fueron observadas.

Según la secuencia temporal

De cohorte transversal, dado que la investigación se acató en un periodo de tiempo determinado, es decir, en un solo momento y con un sólo bloque de resultados, durante el periodo académico 2024-1S.

Según la cronología de los hechos

Fue retrospectivo ya que se refiere a información de documentación ya publicada como artículos o sitios web confiables que contuvo información sobre el tema investigativo planteado, para lo cual se recolectó la mayor cantidad por documentos para la estructuración del contenido que fue investigado.

Población y muestra

Población

La población de estudio quedó constituida principalmente por 75 publicaciones en artículos científicos que contienen información acerca de hirsutismo, manifestaciones clínicas y estudios hormonales mediante pruebas de laboratorio. Por lo que, se seleccionó la población y se recolectó información en artículos publicados en bases de datos de gran impacto a nivel mundial como Pubmed (18), Scielo (13), Lilacs (12), Elsevier (14), Google académico (18), también de redes web oficiales como la OMS, publicados durante el periodo de los 10 últimos años.

Muestra

Se aplicó criterios de selección, tomando en cuenta que se encuentre la mayor parte del tema de estudio y se identifique con las variables de interés, seleccionando un total de 23 publicaciones para el desarrollo investigativo con información estrictamente requerida, lo que constituye la muestra, tomadas en diferentes bases científicas distribuido de la siguiente manera: Pubmed (8), Scielo (4), Lilacs (3), Elsevier (5), Google académico(3), donde se encontró información relevante sobre el tema; manifestaciones clínicas y estudios hormonales teniendo prioridad con los documentos que abarcarán con la temática planteada.

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

- Información actualizada en investigaciones científicas acerca de hirsutismo sus manifestaciones clínicas y estudios hormonales.
- Artículos científicos referente al tema en diferentes idiomas.
- Artículos científicos 10 últimos años de haber sido publicados.

Criterios de exclusión

- Información de artículos científicos que se demostrarán incompletos e irrelevantes.
- Artículos bibliográficos que no contribuyen los objetivos planteados.
- Información con más de 10 años de publicación.

Métodos de análisis

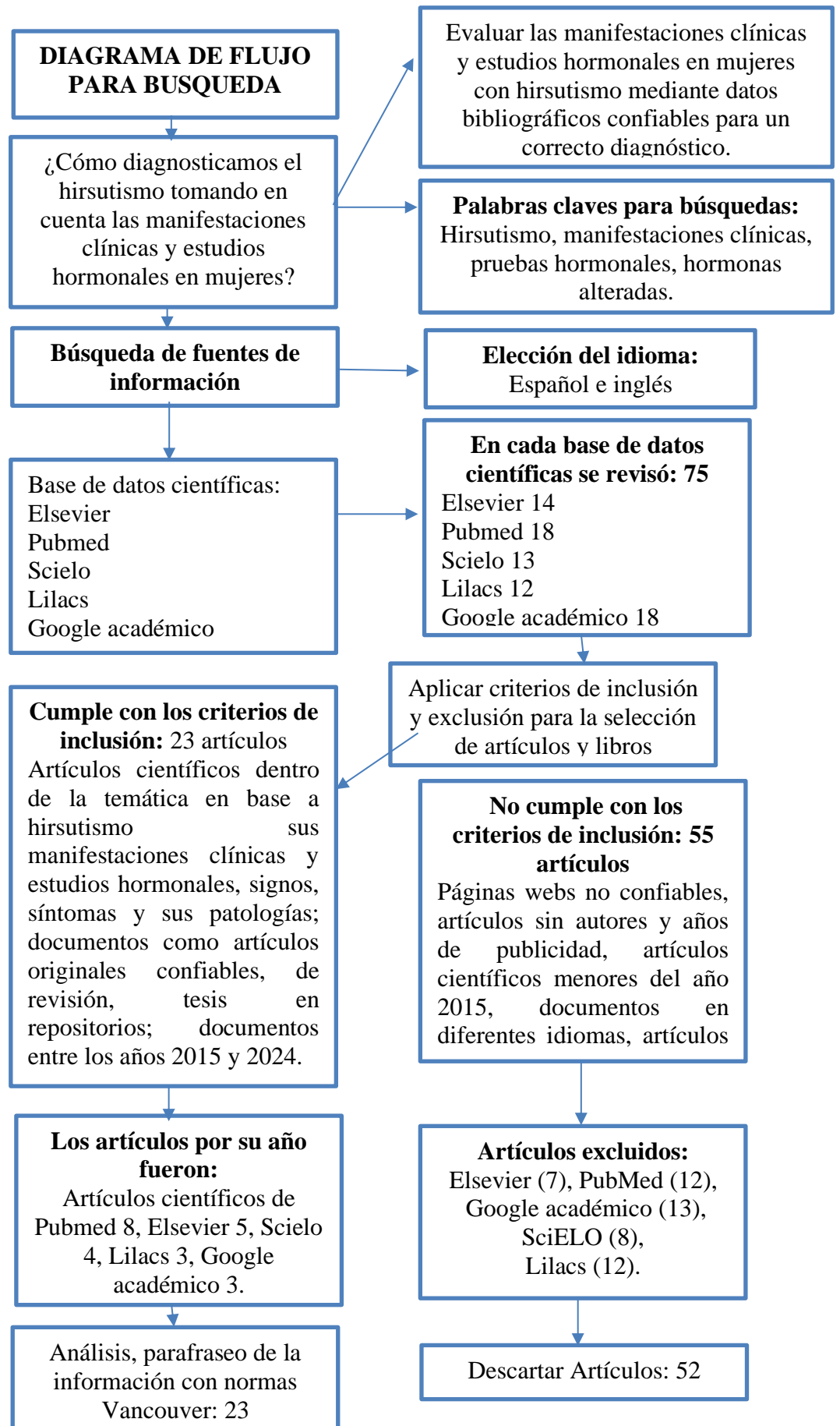
Las fuentes de información obtenidas en base a la revisión bibliográfica fueron evaluadas a partir de métodos como análisis y síntesis deduciendo la información a las variables diferentes en artículos científicos, hirsutismo sus manifestaciones clínicas y estudios hormonales, a partir del enfoque del método teórico planteado.

Técnicas y procedimientos

La técnica que se utilizó fue la observación, mientras que el procedimiento fue mediante la revisión de las distintas bases de datos de información bibliográfica, para la recolección y tratamiento de la información descriptivamente.

Consideraciones éticas

El trabajo investigativo es recopilado mediante revisiones bibliográficas, basándose en la recolección de datos confiables y actualizados cumpliendo con todas las normas de Anti-plagio y no requiere la aprobación del comité de bioética.



CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de encontrar las manifestaciones clínicas y estudios hormonales para el diagnóstico patológico, se expone a continuación tablas en donde se compara el estudio en varios investigadores. La información bibliográfica está principalmente enfocada en la prevalencia, características clínicas, patologías y pruebas hormonales más evidentes para el diagnóstico por esta afección. Para poder plasmar estos datos se tomó en cuenta los criterios de selección la cual proporcionó información que ayudo a cumplir con los objetivos del tema planteado.

Tabla 1. Manifestaciones clínicas con signos y síntomas según la edad en presencia de hirsutismo.

N°	Autor	Población	%	Edad (años)	Enfermedades	Manifestaciones Clínicas
1	Fitzgerald ⁵¹	70	25	20-30	Virilización	Aumento de la masa muscular, engrosamiento de la voz, aumento libido, disminución en el tamaño mamario
2	Hernández et al ⁴	41	30	15-20	Hiperandrogenismo	Acné, seborrea, cambios en el tono de voz, sudoración excesiva y aumento de los labios mayores.
3	Cortés et al ⁷¹	81	15	20-45	Hipertriosis	Acné, aumento de la masa muscular, atrofia mamaria, masa abdominal o pélvica.
4	Forga ¹	45	5	12-15	Idiopático o familiar	Genético o racial, sin signos de disfunción androgénica.
5	Khattak ⁷³	57	20	14-30	Infertilidad	Ciclos menstruales irregulares, dolor pélvico, cambios hormonales, ausencia ovulación, perdida del cabello.
6	Vázquez ⁷⁵	41	2	15-25	Clitoromegalia	Aumento tamaño del clítoris, dolor o incomodidad abdominal, sensibilidad aumentada.
7	Franik ⁷⁴	23	3	12-24	Alopecia androgénica	Adelgazamiento difuso, aumento la visibilidad del cuero cabelludo, disminución la regeneración capilar, calvicie.
Total			100			

Análisis e Interpretación

Los resultados alcanzados en la tabla 1, se evidencian las manifestaciones clínicas presentes en las alteraciones hormonales, las mismas que se recopilaron por diferentes autores indicando sus principales signos y síntomas como acné y aumento de masa muscular, mencionadas con frecuencia en todas las publicaciones publicadas presentando con afecciones como hiperandrogenismo 30%, virilización 25%, infertilidad 20%, hipertricosis 15%, idiopático o familiar 5%, clitoromegalia 2%, alopecia androgénica 3%. Estos resultados son evidenciados con la prevalencia de un 100% de las manifestaciones clínicas presentes en la enfermedad.

Discusión

Datos que al ser comprobados mediante revisiones bibliográficas actualizadas y confiables, Fitzgerald⁵¹, menciona que es una enfermedad clínica frecuente, siendo este a la vez benigno y desagradable para las mujeres durante la adolescencia, a veces se puede dar en adolescentes tardías o adultas por la presencia virilización con síntomas como aumento de musculatura, engrosamiento de la voz y atrofia mamaria. Por otro lado, para Forga¹, dice que es un patrón de crecimiento excesivo por vello terminal en zonas dependientes andrógenos, por el aumento androgénico en las glándulas sebáceas y apocrinas que al parecer puede generarse de sus descendientes indicando las mismas manifestaciones clínicas anteriores.

Cortés et al⁷¹ confirma que el hirsutismo resulta una interacción entre las concentraciones sistémicas de andrógenos, locales los folículos pilosos y un umbral de sensibilidad a los andrógenos causando hipertricosis una apariencia de pelo lanudo en ocasiones con síntomas como atrofia mamaria y aumento de masa muscular, por lo que Khattak⁷³, dice que se demostró que las manifestaciones clínicas tienen un efecto significativo en los indicadores de calidad de vida relacionados con la salud provocando afecciones secundarias en las hormonas causando en diferentes mujeres infertilidad con signos y síntomas como presencia de acné, aumento en la masa muscular, labios mayores, cambio en la voz, sudoración excesiva, ciclos menstruales irregulares, dolor pélvico y ausencia de ovulación.

Datos comprobados en fuentes bibliográficas confiables, Hernández et al⁴, mencionan que la enzima 5 α -reductasa tiene un alto grado de esta afección, al pasar por un estado de hiperandrogenismo padecerá de diferentes efectos en el organismo, primarios o secundarios por lo que esta puede influir y transformarse la testosterona en dihidrotestosterona y el metabolito activo, mientras que Vázquez⁷⁵, dice que la dihidrotestosterona a partir de la enzima 5 α -reductasa que al existir las dos enzimas cromosoma 5 y cromosomas 2, se puede retener la testosterona en andrógenos activos provocando manifestaciones clínicas como clitoromegalia con síntomas dolorosos y sensibles.

Khattak⁷³ confirma que la infertilidad se debe a que los ovarios no producen óvulos en la que hay proliferación celular de la teca, pero sin embargo las cifras andrógenos son mayores en esta manifestación clínica afectando a diferentes hormonas al pasar por fármacos que provocan esta enfermedad, como menciona Franik⁷⁴, que en pacientes con hirsutismo clínico no documentado por los bioquímicos androgénicos actuales la DHEAS, se encontró un gran aumento en el glucurónido androstenediol 3 α -3 β , afectando más a mujeres con signos y síntomas como disminución en regeneración capilar, calvicie, alopecia androgénica que son necesarias ser analizadas mediante sus pruebas principales para su diagnóstico.

Tabla 2. Patologías con valores hormonales alterados causantes de hirsutismo de acuerdo a la edad.

N°	Autor	Población	%	Edad (años)	Patologías	Hormonas alteradas	Valores normales	Valores alterados
1	Badawy et al ⁷⁸	32		6-12	Hiperplasia	Androstenediona	0,75-3,1 ng/mL	4,01±0,65
	Lana et al ⁷⁷	48	15	10-18	suprarrenal	Testosterona	2-64 ng/dL	1,00±1,07
	Jarro ⁵⁹	24		16-25	congénita	Estradiol	<0.2 ng/mL	450±25,2
2	Khattak ⁷³	57		14-20	Síndrome del Ovario Poliquístico	Testosterona	2-64 ng/dL	1,09±1,10
	Juszczak et al ⁶¹	23	30	12-24		Hormona luteinizante	2,12-10,89 mUI/mL	6,1±4,6
	Arley ⁶⁰	32		20-35		Globulina portadora de hormona sexual	24-110,07 nmol/L	118,05±21
3	Hernández et al ⁷⁶	28	10	5-12	Síndrome de Cushing	17 OH Progesterona	0,20 – 1,30 ng/mL	0,10±2,9
4	Lemos et al ⁶⁷	28	25	15-28	Hiperandrogenismo	Sulfato de deshidroepiandrosterona	1,3 – 9,8 ng/mL	13,2±0,9
5	Naranjo et al ⁵²	81	20	20-45	Hipertriosis	Hormona folículo estimulante		6,8±0,2
Total			100					

Análisis e Interpretación

Los resultados obtenidos en la tabla 2, especifica las patologías con valores hormonales alterados causantes de hirsutismo en base a la edad, se evidencia síndrome de ovario poliquístico 30%, hiperandrogenismo 25%, hiperplasia suprarrenal congénita 15%, síndrome de Cushing 10%, hipertricosis 20%. Estos resultados son evidenciados con el afecto de las patologías más prevalentes en Hirsutismo.

Según las patologías presentadas como hiperplasia suprarrenal congénita las hormonas más alteradas son Androstenediona con una media $4,01 \pm 0,65$, Testosterona $1,00 \pm 1,07$, Estradiol $450 \pm 25,2$, síndrome de ovario poliquístico, la Testosterona $1,09 \pm 1,10$, Hormona luteinizante $6,1 \pm 4,6$, Globulina portadora de hormona sexual $118,05 \pm 21$, síndrome de Cushing, 07 OH Progesterona $0,10 \pm 2,9$, Hiperandrogenismo, DHEAS $13,2 \pm 0,9$, Hipertricosis, FSH $6,8 \pm 0,2$.

Discusión

Datos que al ser comprobados por medio de cita bibliográficas actualizadas, Badawy et al⁷⁸ menciona que al aumentar la cantidad de andrógenos circulantes o aumentar la sensibilidad en estos, son métodos posibles de padecer por hiperplasia suprarrenal congénita en la que se alterara principalmente la androstenediona. Por otro lado, Jarro³⁹ dice que se presenta diversas formas, incluidos distintos grados de gravedad, alterándose sus principales hormonas como son testosterona, estradiol y androstenediona en la patología de hiperplasia suprarrenal congénita. Lana et al⁷⁷ asegura que en esta patología estará aumentado la androstenediona y testosterona, mientras que el estradiol se verá disminuido.

Khattak⁷³ manifiesta que la testosterona es una de las principales hormonas masculinas que causan esta enfermedad, aumentando el vello, debido a que estimula el crecimiento del vello corporal. Juszczak et al⁶¹ menciona que, para el diagnóstico del síndrome de ovario poliquístico, la hormona luteinizante es relevante para su estudio, por lo que permite estimular la síntesis androgénica y los totales específicos en comparación a los valores normales, por lo que esta prueba permite diagnosticar a esta patología. Arley⁶⁰ indica que al elevarse la Globulina portadora de hormona sexual la mujer proveniente puede llegar a padecer la afección en la que es necesaria para su diagnóstico respectivo.

Hernández et al⁷⁶ confirma estos resultados que, entre las concentraciones sistémicas de andrógenos, locales de los folículos pilosos y umbral de sensibilidad a los andrógenos donde se elevan los valores de 17 OH Progesterona causando síndrome de Cushing, en el cual al simplificar el método de evaluación y reducir el número de áreas corporales evaluadas, se puede reducir el potencial de error y variabilidad entre observadores. Lemos et al⁶⁷, manifiesta que se presentan diferentes patologías al pasar por un cuadro de hirsutismo pasara por un hiperandrogenismo por lo que es de gran utilidad realizar el examen de DHEAS para su respectivo diagnóstico efectivo que pueda ser controlado a tiempo.

Datos que, al ser comprobados por fuentes bibliográficas actualizadas, Lemos et al⁶⁷, menciona que ha sido descrito en aquellas pacientes donde se encuentra 3α - 3β androstendiol, glucuronido causando hiperandrogenismo aumentado los niveles de DHEAS y disminuyendo en mujeres menopáusicas, Naranjo et al⁵², dice que en la sangre se miden los niveles de la Hormona estimulante de la tiroides y otros parámetros los que dependen de sus resultados analíticos y sospechas diagnósticas de la patología Hipertriosis, que al no ser tratada a tiempo esta provocara trastornos hormonales causando a la mujer una apariencia de exceso de vello lanudo desde la edad reproductiva de diferentes mujeres.

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de las pruebas hormonales para el diagnóstico de hirsutismo.

Nº	Autor	Población	%	Pruebas de Laboratorio	Sensibilidad	Especificidad
1	Castellano et al ⁶²	19	2	Testosterona total	40-95%	80-90%
2	Campostrini ⁶³	25	3	Testosterona libre	60-90%	90-95%
3	Granda et al ⁶⁴	27	10	Globulina portadora de hormona sexual – SHBG	80-90%	50-70%
4	Pinheiro et al ⁶⁵	83	16	17 OH Progesterona	90-100%	50-95 %
5	Seen ⁶⁶	21	17	Androstenediona	95%-100 %	80-95%

6	Echeverría ⁷⁰	28	20	Sulfato de deshidroepiandrosterona DHEA-S	80-95%	80-90 %
7	Lawrenz et al ⁶⁸	62	5	Hormona folículo estimulante FSH	80-95%	50-70%
8	Kawakita ⁶⁹	73	4	Hormona luteinizante LH	50-80%-	30-60 %
9	Aguillón et al ⁷²	124	9	Estradiol	70-90%	50-60 %
Total			100			

Análisis e Interpretación

En la tabla 3 se evidencia el análisis de sensibilidad y especificidad de las pruebas hormonales para el diagnóstico patológico, en la cual las principales pruebas cuentan con una sensibilidad de 80-90% en 17 OH Progesterona, androstenediona, DHEAS, estradiol y SHBG para el respectivo diagnóstico mientras que, entre el 50 y 80% de especificidad en las pruebas como testosterona total y libre, FSH, LH, por lo que indica que 100 mujeres con los valores alterados en las pruebas hormonales, 20-40 tienen hirsutismo, las demás mujeres se debe por diferentes fármacos..

Discusión

Castellano et al⁶² menciona que una sensibilidad alta significa que las pruebas hormonales son buenas para detectar hirsutismo en mujeres que realmente tienen y una especificidad alta significa que las pruebas hormonales son buenas para descartar esta patología que realmente no lo tienen, en el caso de la testosterona total esta permitirá descartar esta enfermedad. Según Campostrini⁶³ define que las pruebas hormonales tienen una sensibilidad y especificidad más altas en el caso de causas hormonales de hirsutismo, como el SOP. En el caso no hormonales de hirsutismo, la sensibilidad y especificidad de las pruebas hormonales son más bajas por lo que la testosterona libre detectara la enfermedad.

Granda et al⁶⁴, especifica que las pruebas hormonales no son lo suficientemente sensibles para confirmar el diagnóstico patológico, es decir, es posible que una mujer con esta enfermedad tenga resultados alterados en las pruebas hormonales, una prueba factible sería la SHBG con una sensibilidad alta. Esto puede conducir a un buen diagnóstico y a un tratamiento adecuado. Sin embargo, las pruebas hormonales según Pinheiro et al⁶⁵ detalla que es normal en mujeres que no tienen SOP, por ejemplo, las pruebas hormonales pueden ser normales con otras causas de hirsutismo, como la exposición a esteroides anabólicos en la que 17 OH Progesterona es la prueba adecuada para detectar esta afección.

Por otro lado, Seen⁶⁶, corrobora que las pruebas hormonales tienen una alta especificidad en la prueba androstenediona lo que significa que son muy buenas para descartar la enfermedad, es decir, es muy poco probable que una mujer sin esta patología tenga resultados alterados

en las pruebas hormonales. Echeverría⁷⁰ define que las pruebas hormonales pueden ser útiles, pero no son lo suficientemente confiables para confirmar el diagnóstico, en caso de sospecha de hirsutismo, se recomienda realizar una evaluación clínica completa, analizando la historia clínica, exploración física mediante la observación y de ser necesario un examen de imagen, posterior realizar el examen DHEAS detectará el diagnóstico final.

Castellano et al⁶², indica que la especificidad de las pruebas hormonales es generalmente baja ya que la probabilidad de que un resultado normal de la prueba marque realmente la presencia patológica ya que la especificidad puede variar en función de la causa. Aguillón et al⁷², menciona que las pruebas de andrógenos, como estradiol, androstenediona y DHEAS, son más sensibles para detectar el diagnóstico causado por una condición que produce niveles elevados de andrógenos y SOP.

Lawrenz et al⁶⁸ señalan que las pruebas hormonales son un método útil para el diagnóstico de hirsutismo, especialmente para detectar causas endocrinológicas, sin embargo, es importante tener en cuenta que estas pruebas no son específicas y pueden dar resultados falsos negativos en un examen de FSH. Por lo tanto, Kawalita⁶⁹ dice que es importante que el diagnóstico se confirme con otros métodos, como la evaluación de la historia clínica, exploración física o la prueba de imagen en caso de ser necesario detectando con la prueba LH por daño ovárico o suprarrenal o se debe a varios factores, como la variabilidad de los niveles de hormonas masculinas, la influencia de otros factores en el crecimiento del vello.

Castellano et al⁶² dice que en general, la sensibilidad de las pruebas hormonales para el hirsutismo es alta, pero es importante tener en cuenta que no son completamente fiables, si una mujer tiene un resultado alterado en la prueba, es importante que consulte con un médico para determinar la causa de la patología. Mientras que Aguillón et al⁷² detalla que la sensibilidad de las pruebas hormonales se refiere a la capacidad de las pruebas para detectar la presencia patológica se suelen realizar en el primer o segundo día del ciclo menstrual, ya que los niveles hormonales sexuales fluctúan a lo largo del ciclo, en mujeres mayores de 40 años, se realiza las pruebas hormonales dos veces, una en el primer o segundo día del ciclo menstrual y otra en la semana anterior a la ovulación.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

- En la investigación se evidenció que los signos y síntomas presentes en mujeres con hirsutismo fue la aparición de acné, engrosamiento de la voz y aumento muscular por la hiperproducción de andrógenos provocando exceso abundante de vello, siendo una de las manifestaciones clínicas más frecuentes el hiperandrogenismo en un intervalo entre 15 a 20 años presentando varias alteraciones hormonales.
- Las patologías que se indican en el hirsutismo son hiperplasia suprarrenal congénita, síndrome de Cushing, pero con mayor frecuencia el síndrome de ovario poliquístico desde un aproximado 14 a 35 años en edad reproductiva, los cuales se ven afectados debido al aumento o disminución de las hormonas como la testosterona, hormona luteinizante y globulina portadora de la hormona sexual.
- Para el diagnóstico de esta enfermedad se utilizaron dos tipos de pruebas, las principales conformadas por testosterona, androstenediona, SHBG, 17 OH Progesterona, DHEAS y las secundarias como la LH, FSH y estradiol, destacando aquellas que presentan una mayor sensibilidad como la 17 OH Progesterona, SHBG, DHEAS y estradiol, mientras que con una alta especificidad la Androstenediona, testosterona y FSH.

BIBLIOGRAFÍA

1. Forga Llenas L. Hirsutismo. Enfoque diagnóstico y terapéutico. Revista de Formación Continuada de la Sociedad Española de Medicina de la Adolescencia (SEMA). [Internet] el 01 de mayo de 2021 [citado el 01 de abril de 2024] IX(2). Disponible en: https://www.adolescere.es/revista/pdf/volumen-IX-n2-2021/2021-n2-138_146-Caso-clinico-Hirsutismo-Enfoque-diagnostico-y-terapeutico.pdf
2. Ministerio de Salud Publico. Norma y Protocolo de Planificación Familiar. [Internet] el 28 de junio de 2017 [citado el 06 de abril de 2024]. Disponible en: <https://enlace.17d07.mspz9.gob.ec/biblioteca/prov/guias/guias/Norma%20y%20protocolo%20de%20planificaci%C3%B3n%20familiar.pdf>.
3. Moya C, González L. Hirsutismo: manejo inicial en APS. Revista de Medicina Familiar. [Internet] el 14 de abril de 2021 [citado el 14 de abril del 2024]. Disponible en: <https://medicina.uc.cl/publicacion/hirsutismo-manejo-inicial-en-aps/>.
4. Hernández G, Gómez G. Hirsutismo y estados hiperandrogénicos. Revista Colombiana de Endocrinología Ginecológica. [Internet]. el 03 de marzo de 2020. [citado el 14 de abril del 2024] 26(3). Disponible en: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2021/06/1253773/26_3-36-53.pdf
5. Maset J. Hirsutismo. Cinfasalud. [Internet] 08 de mayo de 2017 [citado el 16 de abril del 2024]. Disponible en: <https://cinfasalud.cinfa.com/p/hirsutismo/>.
6. Aranceta B. Prevalencia de sobrepeso, obesidad y obesidad abdominal en población española entre 3 y 24 años. Estudio ENPE. Revista Española De Cardiología. [Internet] 08 de mayo de 2020; 73(4). [citado el 16 de abril del 2024]. Disponible en: <https://www.revespcardiol.org/es-prevalencia-sobrepeso-obesidad-obesidad-abdominal-articulo-S0300893219303306>.
7. Maroto A, Navarrete R. Actualización sobre el tratamiento de la infertilidad en el síndrome de ovario poliquístico SOP. Revista Ciencias Ecuador. [Internet] 02 de diciembre de 2023; 5(22). [citado el 18 de abril del 2024]. Disponible en: <https://cienciaecuador.com.ec/index.php/ojs/article/view/145>.

8. Negalur B. HIRSUTISM. *Med. Res. Chronicles*. 2019; 6(5), (249-251) [Internet]. 04 de mayo de 2019; 5(22). [citado el 18 de abril del 2024]. Disponible en: <https://medrech.com/index.php/medrech/article/download/396/396/>
9. Hafsi W, Kaur J. Hirsutism. Departamento de Salud y Servicios Humanos. EEUU. [Internet]. 03 de mayo de 2023 [citado 18 de abril del 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470417/#article-22904.s7>.
10. Naheed A, Zehra T, Aamir R. Prevalencia y correlación del hirsutismo idiopático con el índice de masa corporal. *P J M H S*; 15(8). [Internet]. 22 de agosto de 2020 [citado 18 de abril del 2024]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541220302432>
11. Giurgiovich AJ. Hirsutismo: diagnósticos diferenciales y tratamiento. *Revista Fasgo*. 2021; 1(24). Federación Argentina de Sociedades de Ginecología y Obstetricia. [Internet]. 01 de mayo de 2024 [citado 20 de abril del 2024]. Disponible en: https://www.fasgo.org.ar/images/Revista_2024_21.pdf
12. Velázquez E, Hirsutismo: aproximación al diagnóstico y tratamiento. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*; 14(3). [Internet]. 03 de octubre de 2016 [citado 20 de abril del 2024]. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-31102016000300002
13. Muros F, García C. Hirsutismo y acné: a propósito de un caso. *Medicina de Familia. Semergen*. 2(14). [Internet]. 03 de marzo de 2019. [citado 20 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-familia-semergen-40-congresos-14-congreso-autonomico-semergen-cantabria-116-sesion-casos-clinicos--6282-comunicacion-hirsutismo-y-acne-a-proposito-75524-pdf>
14. Cantalejo G. Hirsutismo. *Middlesex Health*. [Internet]. 03 de enero de 2024. [citado 20 de abril de 2024]. Disponible en: <https://middlesexhealth.org/learning-center/espanol/enfermedades-y-afecciones/hirsutismo>
15. Bonifaz A. Dermatología. *Revista Mexicana*. 6(66). [Internet]. 28 de diciembre de 2022. [citado 20 de abril de 2024]. Disponible en: <https://dermatologiarevistamexicana.org.mx/volumen-66-numero-6-noviembre-diciembre-2022/>
16. Lourdes I, Victoria S. Hiperandrogenismo. *Revista Asociación Española de pediatría y Servicio de Endrocronología de Barcelona*. 91(13). [Internet]. 09 de septiembre de 2019.

- [citado 26 de abril de 2024]. Disponible en: https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/06_hiperandrogenismo.pdf
17. Estrada R. Dermatología. Órgano de la Sociedad Mexicana. Revista de Dermatología y de la Academia Mexicana. 2022 Junio; 67(1). [Internet]. 07 de mayo de 2023. [citado 26 de abril de 2024]. Disponible en: <https://dermatologiarevistamexicana.org.mx/wp-content/uploads/2023/05/dermaMAY-JUNcompleto.pdf>
 18. Ibáñez L, Salas V. Hiperandrogenismo. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM). 2019 Enero; 91(105). [Internet]. 09 de septiembre de 2019. [citado 26 de abril de 2024]. Disponible en: https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/06_hiperandrogenismo.pdf
 19. García F. Síndrome de ovario poliquístico y calidad de vida. Iberoamericana de Fertilidad. 2022 Marzo; 39(1). [Internet]. 01 de enero de 2022. [citado 28 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.revistafertilidad.com/index.php/rif/article/view/59>
 20. Matheson E, Bain J. Hirsutism in Women. Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina. 2019; 100(3) 168-175. [Internet]. 01 de agosto de 2019. [citado 28 de abril de 2024]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31361105/>
 21. Guzmán J, Robles P, Rivera O, Hirsutismo, andrógenos normales y diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico. Unidad de Endocrinología Ginecológica. 2022; 12(8). [Internet]. 09 de septiembre de 2019. [citado 28 de abril de 2024]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/muis/v33n3/0121-0319-muis-33-03-21.pdf>
 22. Lindén A. Hiperandrogenismo y riesgo cardiometabólico en mujeres pre y posmenopáusicas. Clínica Endocrinológica y metabolismo. 2023; 12(10) [Internet]. 09 de octubre de 2019. [citado 04 de mayo de 2024]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/pdf/end/v29n3/a04_318.pdf
 23. Soares J, Guimaraes Z, Santos R. Systematic review of finasteride effect in women with hirsutism. Universidade de Sao Paulo, School of Medicine. Revista de Asociación Médica Brasileña. 67(7). [Internet]. 07 de julio de 2021. [citado 04 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/kCLg7GYPJtpmGRwfFkB4yJG/>
 24. Pérez R. El análisis de la situación de salud y la participación social. Revista Cubana de Salud Pública. [Internet]. 24 de junio de 2015. [citado 04 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=63101>

25. Sachdeva S. Hirsutism: Evaluation And Treatment. *Indian J Dermatol.* 55(3-7). [Internet]. 19 de abril de 2021. [citado 08 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.binasss.sa.cr/abr24/63.pdf>
26. Bode D. Hirsutism in Women. *American Academy of Family Physicians.* 85(4). [Internet]. 19 de abril de 2021. [citado 08 de mayo de 2024]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/221833293_Hirsutism_in_Women
27. Davis SR, Burger HG. Hirsutism. *Epidemiology and Preventive Medicine Alfred Hospital.* 1(236-238). [Internet]. 18 de abril de 2017. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cen.13259>
28. Hantash BM. Dermatologic Manifestations of Hirsutism. *Medscape.* 2019 Junio; 1(1). [Internet]. 19 de abril de 2021. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://emedicine.medscape.com/article/1072031-overview>
29. Ferguson AM, Cervinski MA. Chapter 5 - Endocrine disorders of the reproductive system. *Handbook of Diagnostic Endocrinology.* 2021 Enero; 1(157-180). [Internet]. 19 de abril de 2021. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.clinicalkey.es/#!/browse/book/3-s2.0-C20170001039>
30. Mahmood T. Hirsutism. *Handbook of Obesity in Obstetrics and Gynecology.* 2023 Diciembre;(29-40).). [Internet]. 18 de abril de 2017. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://buecherinsel.buchkatalog.at/handbook-of-obesity-in-obstetrics-and-gynecology-9780323899048>
31. Waldman IN, Legro RS. Polycystic Ovary Syndrome. *The Ovary (Third Edition).* 2019 Julio; 2(415-435).). [Internet]. 18 de abril de 2017. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/archivo_1.pdf
32. Tosti A. Diseases of Hair and Nails. *Goldman's Cecil Medicine (Twenty-Fourth Edition).* 2022 Marzo; 2(2551-2556). [Internet]. 18 de abril de 2017. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://search.worldcat.org/es/title/Goldman's-Cecil-Medicine/oclc/830351126>
33. Lifeder L. Hornomas de los ovarios. [Online]. [Internet]. 22 de agosto de 2023. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/spanish/niosh/topics/reprod/reprodfemalesystem.html>
34. Saude T. Hormonas de glandulas suprarrenales. [Internet]. 22 de agosto de 2023. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/funciones-ovarios/>

35. Mordor I. Tamaño del mercado de tratamiento del hirsutismo y análisis de participación tendencias de crecimiento y pronósticos (2024-2029). Reportes. 2024; 2(6). [Internet]. 22 de agosto de 2023. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/hirsutism-market>
36. Yilmaz B, Okan B. Endocrinología del hirsutismo: de los andrógenos a los trastornos por exceso de andrógenos. 1(19). [Internet]. 19 de septiembre de 2023. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://fi-admin.bvsalud.org/document/view/445qw>
37. Celis A. Ovário androgénico enfoque diagnóstico. [Internet]. 19 de septiembre de 2023. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: http://flasog.org/wp-content/uploads/2022/03/Ovario-Androgenico-Enfoque-diagnostico-y-tratamiento_compressed.pdf
38. Silva C. Hirsutismo. Clinica Universidad de Navarra. 1(4). [Internet]. 02 de marzo 2023. [citado 15 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/hirsutismo>
39. Ortiz AE PE, Araujo M. Protocolo diagnóstico del hirsutismo. 13(18): p. 1029-1032. [Internet]. 21 de octubre 2023. [citado 21 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.medicineonline.es/es-protocolo-diagnostico-del-hirsutismo-articulo-S0304541220302432>
40. Chillaròn J. Hirsutismo: diagnóstico y tratamiento. Servicio de Endocrinología y Nutrición.. 1(27). [Internet]. 22 de agosto de 2020. [citado 21 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://scihub.se/downloads/2020-01-08/58/10.1016@j.fmc.2019.08.002.pdf>
41. Kroon R, Heijer M, Annemieke C. ¿Es idiopático el hirsutismo idiopático? Clinica Quimica. 2022 junio; 531: p. 17-24. [Internet]. 22 de agosto de 2023. [citado 21 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/hirsutismo#:~:text=Hirsutismo%20idiop%C3%A1tico%20o%20familiar.,unidad%20de%20C3%A1rea%20de%20piel>.
42. Campos P. ¿Qué hay de nuevo en hirsutismo? Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Órgano de la Sociedad Mexicana de Dermatología y de la Academia Mexicana de Dermatología. [Internet]. 03 junio de 2022. [citado 21 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://dermatologiarevistamexicana.org.mx/article/que-hay-de-nuevo-en-hirsutismo-fisiopatologia-diagnostico-y-tratamiento/>

43. Chen J, Huang C, Zhang T. Los efectos de las estatinas sobre el hiperandrogenismo en mujeres con síndrome de ovario poliquístico: una revisión sistemática y metanálisis de ensayos controlados aleatorios. *Biología Reproductiva y Endocrinología*. 2021 diciembre; 19(189 [Internet]. 22 de agosto de 2023. [citado 24 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.univadis.es/viewarticle/uso-de-antiandr%C3%B3genos-en-el-s%C3%ADndrome-de-ovario-2023a1000j9c>
44. Domínguez E, Monteagudo G, Carballo O. Síndrome de ovario poliquístico y calidad de vida. *Revista Cubana de Endocrinología*. 3(32). [Internet]. 07 de enero de 2021. [citado 24 de mayo de 2024]. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322015000400007
45. González E. Testosterona Elisa. Desego Morelia distribuidora de equipos y servicios.3725-30 Monobind. [Internet]. 2016 [citado el 30 de abril de 2024]. Disponible en: https://desego.com/wp-content/uploads/2014/07/Testosterona_ELISA_MONOBIND.pdf
46. Mexlab, 2020. Inmunoensayo enzimático para la cuantificación de Testosterona Libre. Elisa. Monobind. [Internet]. 01 de enero de 2024 [citado el 30 de abril de 2024]. Disponible en: <https://reactlab.com.ec/wp-content/uploads/2024/01/free-testosterona-accubind-elisa-.pdf>
47. Wahis, G, 2019. Micropartícula SHBG ELISA. Inmunoensayo. Autobio Diagnost. Europea. [Internet]. 03 de noviembre de 2022. [citado 24 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://reactlab.com.ec/wp-content/uploads/2022/11/Inserto-Autobio-SHBG-1.pdf>
48. ReacLab, 2020. Sistema de prueba 17-OH Progesterona. Monobind Inc. USA. [Internet]. 03 de enero de 2020. [citado 24 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://reactlab.com.ec/wp-content/uploads/2020/01/Inserto-17-OH-Progesterona-AccuLite-ELISA-5275-300.pdf>
49. Dimetra, 2018. Determinación inmunoenzimática de la Androstenediona. Elisa. [Internet]. 09 de septiembre de 2020. [citado 25 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.biovendedor.com/file/14244/DCM00811%20IFU%20Androstenedione%20CEWatermarked.pdf?version=202303080807>
50. Reactlab. Sistema de test de Dehidroepiandrosterona. Monobind aianc. USA. [Internet]. 01 de enero de 2020. [citado 25 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://reactlab.com.ec/wp-content/uploads/2020/01/Inserto-DHEA-AccuLite-ELISA-7475-300.pdf>
51. Fitzgerald, A. Hirsutismo y virilización. *Revista Medicina Large*. [Internet]. 2021. Edición 60 [citado 27 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=3002>

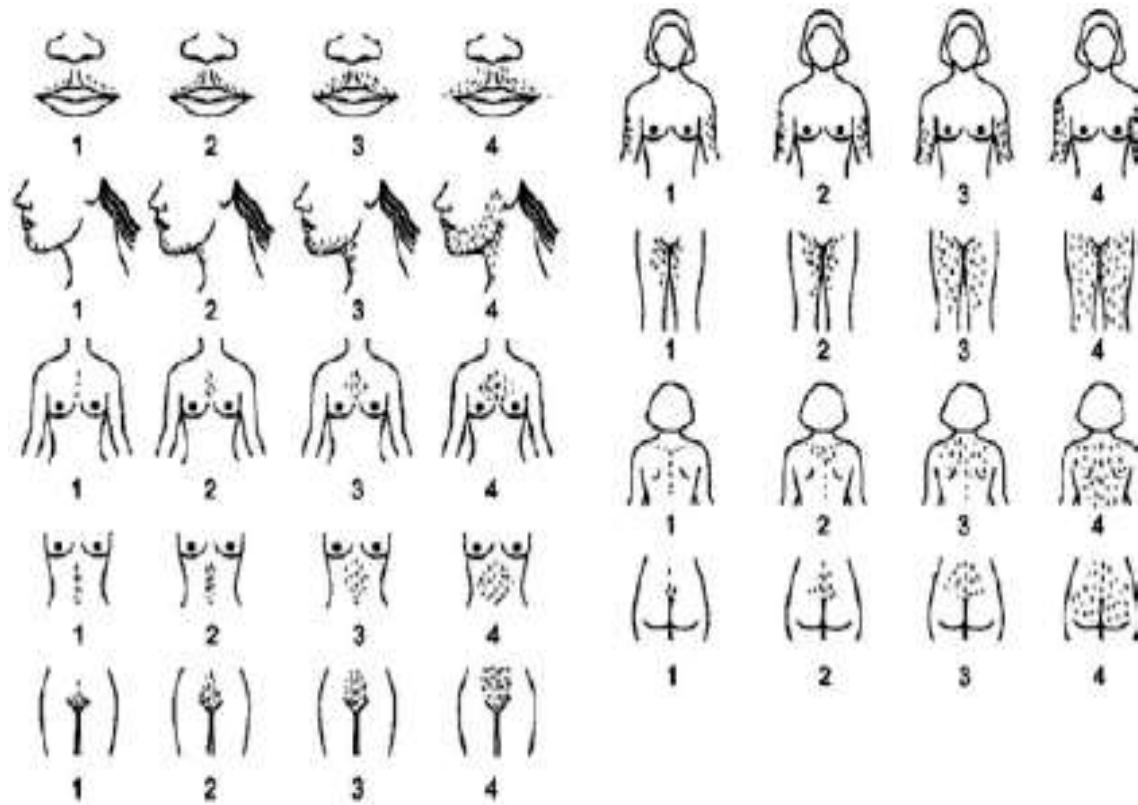
52. Naranjo, A. Montilla, J. Sepúlveda, Luz. Evaluación clínica de vello corporal terminal y prevalencia de hirsutismo en estudiantes universitarias de la ciudad de Manizales. *Biosalud*. Volumen 14. No 1. Pág 36-43. [Internet]. 04 de julio de 2015 [citado el 30 de mayo de 2024]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502015000100004
53. Rodrigo A, Romero E, Barranguero M. Análisis hormonal en la mujer. *Revista Médica WMA Reproducción asistida ORG - HON*. [Internet]. 26 de diciembre de 2023 [citado el 30 de mayo 2024]. Disponible en: <https://www.reproduccionasistida.org/valores-hormonales-en-la-mujer/>
54. Monobind Inc. Follicle Stimulating Hormone (FSH). [Internet]. 01 de enero de 2024 [citado el 30 de mayo 2024]. Disponible en: <https://reactlab.com.ec/wp-content/uploads/2024/01/FSH-425-300A-EIA.pdf>
55. Monobind Inc. Luteinizing Hormone (LH) [Internet]. 2024 [citado el 30 de mayo de 2024]. Disponible en: https://system.netsuite.com/core/media/media.nl?id=1231&c=445858&h=2067525b897ba1561e21&_xt=pdf&addrcountry=US
56. Monobind Inc. Estradiol (E2) [Internet]. 2022 [citado el 01 de junio de 2024]. Disponible en: <https://reactlab.com.ec/wp-content/uploads/2022/07/Estradiol-ELISA-1.pdf>
57. Monobind Inc. TSH [Internet]. 2020 [citado el 01 de junio de 2024]. p. 1–2. Disponible en: <https://reactlab.com.ec/wp-content/uploads/2020/01/Inserto-Monobind-TSH-R%C3%A1pid-o-AccuBind-ELISA-6025-300.pdf>
58. Monobind Inc. Cortisol [Internet]. 2019. [citado el 01 de mayo de 2024] p.1–2. Disponible en: <content/uploads/2024/01/3675-300-Cortisol-V.A-09-05-06esp.pdf>
59. Jarro, C. Tendencias actuales de la hiperplasia adrenal congénita, una revisión de la literatura. *Journal of America Health*. Guayaquil. Ecuador. Vol 5. No 2. [Internet]. 2022. [citado el 01 de mayo de 2024] p.1–2. Disponible en: <https://jah-journal.com/index.php/jah/article/view/141/280>
60. Arley R. Síndrome de ovario poliquístico. Universidad de Iberoamérica, San José, Costa Rica *Revista Médica Sinergia*. [Internet]. 2022. [citado el 01 de junio de 2024] Disponible en: <https://revistamedicasinergia.com/index.php/rms/article/view/95/273>
61. Juszczak, A. Morris, D. Grossman, A. Síndrome de Cushing. University Hospital Birmingham NHS Foundation Trust. EEUU. [Internet]. 05 de enero de 2022. [citado el 03 de junio de 2024] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279088/>
62. Castellano, B. Sardá, C. Izar, F. Testosterona en mujeres cogenero menopáusicas.

- Bioscience. Revista Articulo. 05 de octubre de 2022. [citado el 03 de junio de 2024] Disponible en: <https://www.clinicasdoctorlife.com/por-que-las-mujeres-necesitan-testosterona/>
63. Campostrini B. Uso de testosterona en mujeres. RSAEGRE 31(1):18-230 [Internet]. 30 de enero 2023 [citado el 06 de junio de 2024]. Disponible en: <https://revistasaege.com.ar/index.php/revista/article/view/24>
64. Granda N, Jácome J, Vera K, Cartagena Onofre C. Anovulación. Causas y tratamientos salud RECIAMUC. Vol. 5(1): 248-5783. [Internet]. 31 de enero de 2021 [citado 06 junio de 2024] Disponible en: <https://reciamuc.com/index.php/RECIAMUC/article/view/615>
65. Pinheiro S, Clapauch R. 2021. Importancia de la dosis de 17OH-progesterona en el SOP. Endocrinología / Metabolismo. Vol 45. No 4. [Internet]. 31 de enero de 2021 [citado 06 junio de 2024];5(1):248-57. Disponible en: <https://ve.scielo.org/pdf/og/v76s1/art05.pdf>
66. Seen M, Pérez X, Ruíz J. Androstenediona. Sociedad española Endocrinología y Nutrición [Internet]. 31 de enero de 2021 [citado 07 junio de 2024]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-diabetes-nutricion-13-congresos-63-congreso-nacional-sociedad-espanola-148-sesion-neuroendocrinologia-y-suprarrenales-71-comunicacion-determinacion-de-androstendiona-como-86183-pdf>
67. Lemos M, Munich M, Marruecos. 2019. Niveles de sulfato de dehidroepiandrosterona. Endocrinología / Metabolismo. Brasil. [Internet]. 31 de enero de 2021 [citado 07 junio de 2024]. Disponible en: <https://www.labtestsonline.es/tests/dheas>
68. Lawrenz B, Coughlan C, Melado L, Digma, S, Sibal J, Jean A, & Fatemi, H. M. Step-Down of FSH- Dosage During Ovarian Stimulation - Basic Lessons to Be Learnt From a Randomized Controlled Trial. *Frontiers in endocrinology*, 12, 61707. [Internet]. 12 de abril de 2021 [citado 07 junio de 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.661707>
69. Kawakita, T., Yasui, T., Yoshida, K., Matsui, S., & Iwasa, T. Associations of LH and FSH with reproductive hormones depending on each stage of the menopausal transition. *BMC - 2 women's health*, 3(1) 28. [Internet]. 02 de mayo de 2023 [citado 07 junio de 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12905-023-02438>
70. Echeverría S. Fisiopatología y fisiopatología de la LH. *Revista Española de Ciencias Médicas* [Internet]. 02 de mayo de 2019 [citado 07 junio de 2024]. Disponible en: https://www.siicsalud.com/pdf/lh_fisiologia_d2019.pdf
71. Cortés C, Escobar A, Cebada J. 2018. Estrés y cortisol: implicaciones. *Revista Cubana de Cuba de Investigaciones Biomédicas*. [Internet]. 01 de julio de 2018 [citado 07 junio de

- 2024]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002018000300013
72. Aguillón J, Bedoya A, Loango N. Niveles de estradiol en niños y jóvenes. *Revista Biosalud Colombiana*;17(1): 19-30.DOI: 10.17151/biosa.2018.17.1.3. [Internet]. 01 de junio de 2018 [citado 05 junio de 2024]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502018000100019
73. Khattak M, Usman R, Sultana N, Khattak A. Comparison of free androgen index in polycystic ovary syndrome and non-polycystic ovary syndrome infertile patients. *J Ayub Med Coll Abbottabad* [Internet]. 2021 [citado el 05 de junio de 2024];33(4):577–81. Disponible en: <https://jamc.ayubmed.edu.pk/jamc/index.php/jamc/article/view/8121/3171>
74. Franik G, Bizoń A, Włoch S, Kowalczyk K, Biernacka-Bartnik A, Madej P. Hormonal and metabolic aspects of acne vulgaris in women with polycystic ovary syndrome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2018 [citado el 05 de junio de 2024];22(1):4411–8. Disponible en: <https://www.europeanreview.org/wp/wpcontent/uploads/4411-4418-1.pdf>
75. Vázquez J, Calero J, Carías J, Monteagudo G. Correspondencia clínica, hormonal y ecografía en el diagnóstico del síndrome de ovarios poliquísticos. *Revista Cubana de Endocrinología* [Internet]. 2016 [citado el 12 de marzo de 2024];27(1):4–17. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/end/v27n1/end02116.pdf>
76. Hernández Quiceno S, Uribe Bojanini E, Alfaro Velásquez JM, Campuzano Maya G, Salaza Peláez LM. Endocrinología Cortisol: mediciones de laboratorio y aplicación clínica Cortisol. *Medicina & Laboratorio*. 2016;22(3–4):147–64.
77. Lana Harin, Anis Rehman. Estradio. StatPearls Publishing LLC. [Internet]. 2023 [citado el 06 de junio de 2024];27(1):4–17. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31747204/>
78. Badawy MT, Sobeh M, Xiao J, Farag MA. Androstenedione (a Natural Steroid and a Drug Supplement): A Comprehensive Review of Its Consumption, Metabolism, Health Effects, and Toxicity with Sex Differences. *Molecules*. [Internet]. 2021 [citado el 06 de junio de 2024] Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34684800/#:~:text=Androstenedione%20is%20a%20steroidal%20hormone%20produced%20in%20male,that%20is%20being%20utilized%20to%20increase%20testosterone%20levels.>

Anexos

Anexo 1. Diagnóstico de hirsutismo mediante la escala de Ferriman y Gallwey.



Fuente: Escala de Ferriman y Gallwey

Anexo 2. Inserto testosterona total.



Uso Determinación cuantitativa del volumen total de testosterona en suero o plasma humano mediante un inmunoensayo enzimático de microplaca

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

La testosterona, (17 β -hidroxí-4-androsten-3-ona), un esteroide C19, es el andrógeno más potente secretado naturalmente. En los hombres en la etapa de la post pubertad, la testosterona es secretada principalmente por los testículos con solo una pequeña cantidad derivada de la conversión periférica de 4-androsten-3, 17-dione (ASD). En las mujeres adultas, se estima que más del 50% de testosterona en suero se obtiene a partir de conversión periférica de ASD secretado por la glándula suprarrenal y el ovario, con un residuo de secreción directa de testosterona por estas glándulas.

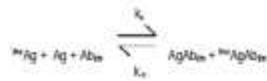
En el hombre, la testosterona es sintetizada principalmente en las células intersticiales Leydig y los testículos, y está regulada por la hormona de estimulación de la célula intersticial (ICSH), o la hormona luteinizante (LH) de la pituitaria anterior (el equivalente femenino de ICSH). La testosterona es responsable del desarrollo de las características del sexo secundario, tales como órganos sexuales, la próstata, vesículas seminales y el crecimiento del vello facial, pubes y axilar. Las mediciones de testosterona han sido más útiles para la evaluación de los estados hipogonadales. El aumento de los niveles de testosterona en los hombres se puede encontrar en la resistencia completa de andrógenos (formación testicular). Las causas más comunes de disminución de los niveles de testosterona en los hombres incluyen hipogonadismo, orquidectomía, terapia de estrógeno, síndrome de Klinefelter, hipoparatiroidismo, insuficiencia hepática y diabetes.

En la mujer, los niveles de testosterona se encuentran normalmente inferiores a los encontrados en el hombre. La testosterona en la mujer proviene de tres fuentes. Es secretada en pequeñas cantidades, por las glándulas suprarrenales y los ovarios, y en mujeres sanas el 50-60% de la producción diaria de testosterona surge del metabolismo periférico de la prohormona, principalmente androstenediona. Las causas más comunes de un aumento de los niveles de testosterona en las mujeres son los ovarios poliquísticos (síndrome Stein-Leventhal), tumores de ovario, tumores adrenales y hiperplasia suprarrenal. La violación en las mujeres está asociada con la administración de andrógenos y la sobreproducción endógena de testosterona. Parece haber una correlación entre los niveles de suero de testosterona y el grado de violación en las mujeres, aunque aproximadamente el 25% de las mujeres con diversos grados de violación tienen niveles de testosterona en suero que caen dentro del intervalo de referencia femenino.

PRINCIPIO Inmunoanálisis Enzimático Competitivo (TIPO 7):

Los reactivos esenciales necesarios para un inmunoensayo incluyen anticuerpos, conjugado enzima-antígeno y antígeno nativo. Al mezclar un anticuerpo marcado con biotina, conjugado antígeno-enzima y un suero con contenido de antígeno nativo, resulta una reacción competitiva entre los antígenos nativos y el conjugado enzima-antígeno de un número limitado de sitios de

unión de antígenos. La interacción se presenta mediante la siguiente ecuación:



Ab_{125} = Anticuerpo inmovilizado monoespecífico (Cantidad Constante)
 Ag = Antígeno Nativo (cantidad variable)
 ${}^{125}\text{I-Ag}$ = conjugado Enzima- antígeno (cantidad constante)
 AgAb_{125} = complejo antígeno-anticuerpo
 ${}^{125}\text{I-Ag/Ab}_{125}$ = Complejo de anticuerpo - Conjugado enzima-antígeno
 k_a = Rango constante de Asociación
 k_c = Rango constante de disociación
 $K = k_c / k_a$ = Constante de equilibrio

Se produce una reacción simultánea entre la biotina adherida al anticuerpo y la estreptavidina inmovilizada en el micro pozo. Esto crea un efecto en la separación de la fracción unida del anticuerpo después de la decantación o de la aspiración.

$\text{AgAb}_{125} + {}^{125}\text{I-Ag/Ab}_{125} \rightarrow \text{estreptavidina} - \text{Complejo inmovilizado} + \text{estreptavidina} - \text{Complejo inmovilizado}$
 $\text{estreptavidina} - \text{Complejo inmovilizado}$ = Estreptavidina inmovilizada en el pozo
 $\text{Complejo inmovilizado}$ = Complejo sandwich adherido a la superficie sólida.

La actividad de la enzima en la fracción de anticuerpos adheridos es inversamente proporcional a la concentración del antígeno nativo. Al utilizar varias referencias de suero de concentraciones conocidas de antígeno, se puede generar una curva de respuesta a la dosis a partir de la cual se puede determinar la concentración de antígeno de una muestra desconocida.

MATERIALES REACTIVOS PROPORCIONADOS:

A. Sueros humano de Referencia - 1ml/vial - Iconos A-G

Siete (7) viales de suero de referencia para Testosterona en concentraciones de 0 (A), 0,1 (B), 0,5 (C), 1,0 (D), 2,5 (E), 5,0 (F) y 12,0 (G) ng/ml. Almacene a 2 - 8 ° C. Se adiciona un conservante. Los calibradores pueden ser expresados en concentraciones molares (nM / L) multiplicándolos por 3,47.

Por ejemplo: 1ng/ml x 3,47 = 3,47 nM / L

B. Testosterona Enzima reactivo - 1,0 ml / vial

Un (1) vial de conjugado la testosterona (análogo)- peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada en la estabilización de una proteína de matriz con tinte verde. Almacene a 2-8 ° C.

C. Búfer conjugado de esteroide-7,0 ml/vial - Icono

Un (1) frasco de reactivo que contiene Búfer, colorante rojo, conservante, y los inhibidores de la proteína de enlace. Almacene a 2-8 ° C.

D. Reactivo Testosterona Biotina - 6,0 ml - Icono

Un (1) botella de reactivo con contenido de conjugado IgG de conejo purificado biotinilado anti-Testosterona en una solución de Búfer, colorante amarillo y conservante. Almacene a 2-8 ° C.

E. Placa recubierta con Estreptavidina - 96 pozos -Icono

Una microplaca de 96 pozos recubiertos con 1,0 ug/ml estreptavidina y envasada en una bolsa de aluminio con un agente de secado. Almacene a 2-8 ° C.

F. Solución de lavado - 20ml - Icono

Un (1) vial que contiene un surfactante en Búfer de solución salina. Se añadió un conservante. Almacene a 2-30 ° C.

G. Sustrato A - 7ml/vial - Icono S

Un (1) vial con contenido de tetrametilbenzidina (TMB) en Búfer. Almacene a 2-8 ° C.

H. Sustrato B - 7ml/vial -Icono S

Un (1) vial contiene peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en Búfer. Almacene a 2 - 8°C.

I. Selección de interrupción de la reacción - 1ml/vial - Icono Un (1) vial que contiene un ácido fuerte (HCl 1N). Almacene a temperatura de 2-30 ° C.

J. Instrucciones del producto.

Nota 1 No utilice los reactivos más allá de la fecha de caducidad.
Nota 2 Los reactivos abiertos son estables durante sesenta (60) días si se encuentran almacenados a 2-8 ° C.
Nota 3 Los reactivos anteriores son para una microplaca sencilla de 96 pozos.

Equipo requerido, pero no proporcionado:

1. Pipeta de 10µl, 50µl y 100µl con una precisión mayor a 1,5%.
2. Dispensador(es) para volúmenes continuos de 0,100ml y 0,300ml con una precisión mayor a 1,5%.
3. Dispensador de volumen ajustable (200 - 1000µl) para conjugado.
4. Lavador de Microplaca o una botella lavadora (opcional).
5. Lector de microplacas con capacidad de absorbancia de longitud de onda de 450nm y 630nm.
6. Papel absorbente para secar pozos de microplaca.
7. Envoltura de plástico o cubierta de microplacas para los pasos de incubación.
8. Aspirador de vacío (opcional) para los pasos de lavado.
9. Cronómetro
10. Materiales de control de calidad.

PRECAUCIONES

Para uso Diagnóstico *in Vitro*

No usar en humanos o animales en forma interna o externa. Todos los productos que contienen suero humano han demostrado ser no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B, VIH 1 y 2 y HCV según pruebas exigidas por la FDA. Debido a que ninguna prueba conocida hasta ahora puede ofrecer una garantía total de ausencia de agentes infecciosos, los productos de suero humano deben manejarse como potencialmente peligrosos y en condiciones de transmitir enfermedades. Los buenos procedimientos de laboratorio para el manejo de productos sanguíneos pueden ser encontrados en el Centro de Control de Enfermedades Instituto Nacional de Salud, "Biosseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biotécnicos", 2da Edición, 1988, HHS Publicación Nº (CDC) 88-8395.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se requiere que se observen las precauciones habituales para la toma de muestras de suero o sangre por punción venosa. Para lograr una comparación precisa a valores normales establecidos, se debe tomar una muestra de suero en ayunas. La sangre debe ser recolecta en tubo para punción venosa de banda roja sin aditivos o anti-coagulantes para suero o tubo con EDTA o heparina. Dejar que la sangre se coagule para las muestras de suero. Centrifugar la muestra para separar el suero o plasma de las células. Las muestras pueden ser refrigeradas a una temperatura de 2 - 8°C por un periodo máximo de cinco (5) días. En caso de que la muestra no se pueda analizar dentro de este tiempo, esta puede ser almacenada a temperaturas de -20°C durante hasta 30 días. Entre la repetitiva congelación y descongelación. Cuando se realizan análisis por duplicado, se necesitan 0,020ml de la muestra.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. **Reactivo enzimático de trabajo** - Estable durante 1 año. Mida 0,7 ml de "Reactivo enzimático activo" y añada al vial el cual contiene Búfer conjugado de testosterona. Almacene a 2-8 ° C.

2. Búfer de lavado

Oluya el contenido de la solución de lavado con 1000ml de agua destilada o desionizada en un contenedor de almacenamiento. El Búfer diluido puede ser almacenado a temperatura ambiente (20-27 ° C) durante un máximo de 60 días.

3. Solución de Sustrato de trabajo - Estable durante 1 año.

Vierta el contenido del vial ambient marcado como Solución 'A' en el vial marcado como Solución 'B'. Coloque la tapa amarilla sobre el vial para facilitar su identificación. Mezcle y etiquete según corresponda. Almacene a 2 - 8 ° C.

Nota: No use el sustrato de trabajo si se ve azul.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Antes de proceder con el ensayo, leve todos los reactivos, sueros de referencia y los controles a temperatura ambiente (20 - 27 ° C).

1. Formate los pozos de microplacas para cada suero de referencia, control y muestra a analizar por duplicado.
 Deutava cualquier tipo de microplaca no utilizada a la bolsa de aluminio, selle y almacene a temperatura de 2 a 8 ° C.

2. Pipete 0,010 ml (10µL) de suero de referencia, control o muestra correspondiente en cada pozo asignado.

3. Añada 0,050 ml (50µL) de Reactivo de Testosterona Enzimática de Intestaje a todos los pozos (vea Sección de Preparación de Reactivos).

4. Agite suavemente la microplaca durante 20-30 segundos para mezclar.

5. Añada 0,050 ml (50µL) de Reactivo de testosterona Biotina a todos los pozos.

6. Agite suavemente la microplaca durante 20-30 segundos para mezclar.

7. Cubra e incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente.

8. Deseche el contenido de la microplaca mediante decantación o aspiración. Si se realiza decantación, seque la placa con absorbente papel.

9. Añada 300µl de Búfer de lavado (ver sección de Preparación de Reactivos), decante o aspire. Repita por dos (2) veces más para un total de tres (3) lavados. **Se puede hacer uso de un lavador de placas automática o manual. Siga las instrucciones del fabricante, para una correcta utilización. En caso de usarse una botella lavadora llene cada pozo apretando el contenedor (juntando los burbujas de aire) para dispensar el lavado. Decante el lavado y repítalo (2) veces más.**

10. Añada 0,100 ml (100µL) de la Solución de Sustrato activo a todos los pozos (ver Sección de Preparación de Reactivos). **Siempre añada los reactivos en el mismo orden con el fin de reducir al mínimo las diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.**

NO AGITELA PLACA DESPUÉS DE ADICIONAR EL SUSTRATO

11. Incube a temperatura ambiente durante quince (15) minutos.

12. Añada 0,050ml (50µL) de Solución de parada a cada pozo y suavemente mezcle de 15 a 20 segundos. **Siempre añada los reactivos en el mismo orden con el fin de reducir al mínimo las diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.**

13. Lea la absorbancia de cada pozo en 450nm en un lector de microplaca (utilizando un longitud de onda de referencia 620-630nm para minimizar las imperfecciones de los pozos). **Los resultados deben leerse dentro de los treinta (30) minutos de la adición de la solución de parada.**

Nota: Diluya las muestras sospechosas de concentraciones superiores a 12 ng/ml 1:5 y 1:10 con el calibrador de Testosterona 0' ng/ml o suero de paciente femenino, con un valor bajo conocido de testosterona.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe realizar pruebas con los controles en niveles de rango bajo, normal y alto para seguimiento del desempeño del ensayo. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y los valores deben ser determinados con cada montaje realizado. Los gráficos de control de calidad deben mantenerse para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear los métodos perfiles estadísticos para determinar las tendencias. Cada laboratorio debe mantener límites aceptables de desempeño. Además, la alterancia mínima debe ser coherente con montajes anteriores. La desviación significativa de un rendimiento establecido puede indicar un cambio no advertido en condiciones experimentales o la degradación del reactivo del kit. Se deben utilizar reactivos frescos para determinar la razón de las variaciones.

CÁLCULO DE RESULTADOS

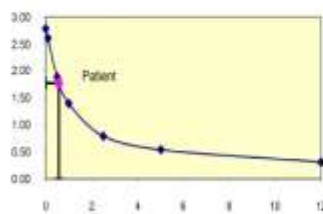
Se utiliza una curva de respuesta a la dosis para determinar la concentración de Testosterona en las muestras desconocidas.

1. Registre la absorbancia obtenida a partir de la impresión del lector de microplaca como se indica en el Ejemplo 1.
2. Grafique la absorbancia para cada suero referencia duplicado frente a la correspondiente concentración de Testosterona en ng/ml en papel gráfico lineal (no promedie los duplicados de los sueros de referencia antes del graficarlo).
3. Una los puntos utilizando una curva de ajuste.
4. Para determinar la concentración de testosterona de una muestra desconocida, ubique la absorbancia promedio de los duplicados para cada muestra desconocida en el eje vertical del gráfico, encuentre el punto de intersección de la curva, y lea la concentración (ng/ml) desde el eje horizontal del gráfico (los duplicados del valor desconocido pueden ser un promedio, como se indica). En el siguiente ejemplo, el promedio de absorbancia (1.704) interseca la curva en la concentración de Testosterona (0.57ng/ml) (Ver Figura 1).

EJEMPLO 1

ID de muestra	Numero de puntos	Abs. (A)	Abs. Media (B)	Valor (ng/ml)
Cal A	A1	2.780	2.787	0
	B1	2.794		
Cal B	C1	2.516	2.611	0.1
	D1	2.646		
Cal C	E1	1.788	1.677	0.5
	F1	1.965		
Cal D	G1	1.381	1.392	1.0
	H1	1.393		
Cal E	A2	0.780	0.788	2.5
	B2	0.796		
Cal F	C2	0.530	0.538	5.0
	D2	0.547		
Cal G	E2	0.351	0.358	12.0
	F2	0.364		
Cal H	G2	1.045	0.780	161
	H2	1.045		
Paciente	A3	1.751	1.764	0.57
	B3	1.778		

* Los datos presentados en el Ejemplo 1 y Figura 1 es sólo con fines ilustrativos y no debe utilizarse en lugar de una curva estándar preparada con cada ensayo.



PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

- Con el fin de que consideren los resultados del ensayo válidos se deben cumplir los siguientes criterios:
1. La absorbancia (OD) de calibrador de 0 ng/ml debe ser ≥ 1.3
 2. Cuatro de cada seis grupos de control de calidad deben encontrarse dentro de los rangos preestablecidos:

LIMITACIONES DE PROCEDIMIENTO

A. Determinación de resultados:

1. Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para resultados reproducibles.
2. El pipeteado de muestras no debe extenderse más allá de diez (10) minutos para evitar la el cruce de los tiempos de ensayos.
3. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva.
4. La adición de la solución de sustrato genera una reacción química, la cual termina mediante la adición de la solución de parada. Por lo tanto, la adición del sustrato y de la solución de interrupción se debe agregar en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
5. Los lectores de placa realizan mediciones verticalmente. No toque la parte inferior de los pocillos.
6. El hecho de no eliminar la adhesión de solución adecuadamente en los pasos de aspiración o decantación puede resultar en una baja replicación y en resultados falsos.
7. Utilice componentes de un mismo lote. No intercambie los reactivos de diferentes lotes.

B. Interpretación

1. Si se utiliza reducción de datos controlados por ordenador para interpretar los resultados de la prueba, es necesario que los valores previstos para los calibradores estén dentro del 10% de las concentraciones asignadas.

RANGOS DE VALORES ESPERADOS

De acuerdo con los intervalos de referencia para una población adulta "normal", los rangos esperados para la prueba Testosterona AccuBind™ de ELISA se detallan en la Tabla 1.

TABLA 1
Valores esperados para el sistema de Prueba de Testosterona EIA (ng/ml)

Masculino	0.1 - 12.0
Femenino	0.1 - 2.5

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de una serie de valores que se pueden encontrar mediante un determinado método para una población de personas "normales" depende de una multiplicidad de factores: la especificidad del método, la población a prueba y la precisión del método en manos del analista. Por estas razones, cada laboratorio debe depender del rango de valores establecidos por el fabricante, sólo hasta que se determina un rango propio mediante los análisis utilizando el método con una población indígena de la zona en la que está situado el laboratorio.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

A. Precisión

La precisión durante y entre ensayos del sistema de prueba Testosterona AccuBind™ Microplacas EIA se ha determinado mediante análisis en tres niveles diferentes de grupos de suero control. El número, valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada uno de estos sueros control se presentan en las tablas 2 y 3.

TABLA 2
Determinación de precisión durante ensayos (valores en ng/ml)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Bajo	22	1.61	0.07	4.5%

Normal	22	4.86	0.25	5.2%
Alto	22	8.19	0.59	7.3%

TABLA 3

Determinación de precisión entre ensayos (valores en ng/ml)				
Muestra	N	X	σ	C.V.
Bajo	10	1.47	0.09	6.3%
Normal	10	4.90	0.29	5.9%
Alto	10	8.99	0.54	6.0%

* Según las mediciones realizadas en diez experimentos por duplicado en un periodo de diez días.

B. Exactitud

El sistema de prueba Testosterona AccuBind™ Microplacas EIA se comparó con un método de inmunanálisis de quimiluminiscencia. Se utilizaron especímenes biológicos de bajo, normales y altos niveles de testosterona (los valores oscilaron entre 0.29 ng/ml - 21.9ng/ml). El número total de tales especímenes fue de 58. La mejor ecuación de regresión y el coeficiente de correlación fueron calculados para este sistema EIA Testosterona en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 4.

CUADRO 4

Método	Media (y)	Análisis de Regresión Cuadrática	Coefficiente de correlación
Este método (y)	3.12	$Y = -0.265 + 0.944 (X)$	0.985
Referencia (X)	3.02		

Sólo leves cantidades de sesgo entre este método y el método de referencia se indican por la proximidad de los valores medios. La ecuación de regresión cuadrática y el coeficiente de correlación presentan una excelente correlación del método.

C. Sensibilidad

El sistema de prueba Testosterona AccuBind™ microplacas EIA presenta una sensibilidad de 0.038ng. Esto es equivalente a una muestra con una concentración de 0.038 ng/ml. La sensibilidad se obtuvo mediante la determinación de la variabilidad del calibrador de suero 0 ng/ml y mediante el uso de la estadística 2σ (95% de certeza) para calcular la dosis mínima.

D. Especificidad

El % de reactividad cruzada del anticuerpo de testosterona para sustancias seleccionadas fue evaluado mediante la adición de la sustancia de interferencia a una matriz de suero en diversas concentraciones. La reactividad cruzada se calculó mediante la obtención de una relación entre la dosis de la sustancia de interferencia con la dosis de testosterona necesarias para desplazar la misma cantidad de antígeno etiquetado.

Sustancia	Reactividad cruzada
Testosterona	1.0000
Androstenediona	0.0009
Oxidotestosterona	0.0178
Cortisona	<0.0001
Corticosterona	<0.0001
Cortisol	<0.0001
Epiandrosterona	<0.0001
Progesterona	<0.0001
17-OH progesterona	<0.0001
Sulfato de DHEA	<0.0001
Estradiol	<0.0001
Estrona	<0.0001
Estirid	<0.0001
hemólisis	<0.0001
tubulosa	<0.0001
Iperita	<0.0001

REFERENCIAS

1. Dorfman, R. and Shippy, R.A. ED. Androgens, New York: John Wiley and Sons, 1956.
2. Holton R, Tai JF. Androstenedione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of conversion to testosterone. J Clin Invest 45: 301-302, 1968.
3. Faiman C and Winter, JSD, Reyes, FJ. Clin Obstet Gynaecol, 3: 467 (1976).
4. Szemienka, PC, Podiatzian, M, 191 (1987).
5. Cummings DC, Wall SR: Non sex hormone binding globulin bound testosterone as a marker for hyperandrogenism. J Clin Endocrinol Metab, 61:673-676, 1985.
6. Lashanly, G, et. al., J Clin Endocrinol Metab,58, 674 (1981)
7. Tietz, MW, ED: Clinical Guide to Laboratory Tests, 3^{ra} ed. Philadelphia, WA Saunders Co, 1995.

Revisión: 1 Date: 07/09 DCO:0153

Cat # 1775-309

Wet	dry	100%
A)	1 (14)	2 (26)
B)	1 (74)	2 (26)
C)	1 (74)	2 (26)
D)	1 (74)	2 (26)
E)	1 (74)	2 (26)
F)	1 (26)	1 (26)
G)	1 (74)	2 (26)
H)	1 (74)	2 (26)
I)	1 (26)	2 (26)

For Orders and Inquiries, please contact

Monobind Inc.
100 North Pointe Blvd
Lake Forest, CA 92550 USA

Tel: 949-851-2565
Fax: 949-851-3530
Email: info@monobind.com
Or On Web: www.monobind.com

Please visit our website to learn more about our other interstitial products and services.



Fuente: Testosterona_ELISA_MONOBIND.pdf

Anexo 3. Inserto de testosterona libre.



Bio-Testosterona Libre *Elisa* Código: 6001015

Inmunoensayo enzimático para la cuantificación de la Hormona Testosterona libre en suero o plasma.

INTENCIÓN DE USO

El kit Testosterona Libre ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de Testosterona Libre en suero o plasma humano.

RESUMEN

La Testosterona es una hormona esteroide del grupo andrógeno. En los individuos masculinos, la testosterona es principalmente secretada por las células Leydig ubicadas en los testículos. En los individuos femeninos es secretada principalmente por los ovarios, y en menor medida por las glándulas suprarrenales. La testosterona es la principal hormona sexual masculina, es un anabólico esteroide y, tanto para hombres como para mujeres, juega un rol importante en la salud y bienestar general. En la circulación sanguínea la Testosterona se encuentra unida a proteínas, dentro de las cuales la más importante es la Globulina fijadora de hormonas sexuales (SHGB). La medición de Testosterona Libre o su fracción no unida en suero ha sido propuesta como un medio de estimar la hormona fisiológicamente bioactiva. Los niveles de Testosterona Libre se observan elevados en mujeres con hiper androgenismo asociado con hirsutismo en la presencia o ausencia de ovarios poli císticos. En suma, la medición de Testosterona Libre puede ser de mejor ayuda que la medición de Testosterona Total en situaciones donde la SHGB se incrementa o decrece (ej. Hipotiroidismo y obesidad).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Testosterona ELISA está basado en un principio de unión competitiva entre la Testosterona encontrada en la muestra y el conjugado Testosterona-HRP conjugada por cantidad constante de anticuerpos Anti-Testosterona de conejo. En la incubación, los micropozos recubiertos con anticuerpos de cabra anti-Testosterona de conejo, son incubados con 25 µl de estándares de Testosterona, controles y muestras del paciente, y con 50 µl del conjugado Testosterona-HRP y con 50 µl del reactivo de conejo anti-Testosterona Libre, durante 60 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación, una cantidad fija de HRP-Testosterona marcada, compete con la Testosterona endógena de los estándares, muestras y controles, por un número fijo de sitios de unión al anticuerpo específico de Testosterona. Así, la cantidad de conjugado Testosterona-peroxidasa inmunológicamente unido al micropozo decrece progresivamente, mientras que la concentración de testosterona en la muestra aumenta. El conjugado Testosterona-peroxidasa no unido es retirado y los micropozos lavados. Seguidamente, se agregan 100 µl de solución TMB y se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos, resultando en una coloración azul. Dicha coloración es interrumpida con la adición de 50 µl solución de frenado y la absorbancia es medida y se lee con un espectrofotómetro a 450 nm.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos con Anti-IgG-Conejo de Cabra	12x8x1
2. Estándares: 6 viales (listos para su uso)	0.5 ml
3. Conjugado Enzimático: 1 frasco (listo para su uso)	7 ml
4. Reactivo Anti-Testosterona (Conejo): 1 frasco (listo para su uso)	7 ml
5. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
6. Solución de Frenado: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
7. Solución de Lavado Concentrado 20X: 1 frasco	25 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.

ALMACENAMIENTO

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipeteo con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este pueden dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8° C) por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20° C hasta un mes.
3. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.
5. Evite utilizar muestras con exceso de lípidos.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

SOLUCIÓN DE LAVADO: Prepare una solución de lavado a 1X, adicionando el contenido de la botella (25 ml, 20 X) a 475 ml de agua destilada o des ionizada. Conserve a temperatura ambiente (18-26° C).

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

No utilice ácido de sodio como preservante ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Dispensar 25 µl de los estándares, control y muestras en los pozos designados.
3. Agregar 50 µl del reactivo Anti-Testosterona en cada pozo.
4. Agregar 50 µl del conjugado enzimático de Testosterona en cada pozo.
5. Agitar suavemente la microplaca por 10 segundos para mezclar los reactivos.
6. Incubar a temperatura ambiente (18-25°C) por 60 minutos.
7. Remover el líquido de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
8. Agregar 100 µl de sustrato TMB en cada pozo.
9. Cubrir e incubar a temperatura ambiente (18-25°C) por 15 minutos.
10. Frenar la reacción agregando 50 µl de Solución de Frenado a cada pozo.
11. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

La curva estándar se construye de la siguiente manera:

1. Calcule el valor de absorbancia media en cada vial estándar. Este valor puede variar de lote a lote. Asegúrese de chequear los valores en cada kit. Tome el ejemplo de estándar adjunto como referencia.
2. Para la construcción de la curva trazar la lectura de absorbancia de los estándares de referencia en eje vertical contra su concentración en eje horizontal en papel gráfico lineal, dibujar la curva de mejor manera posible uniendo los puntos.
3. Utilice los valores de absorbancia media de cada muestra para determinar la correspondiente concentración de Testosterona Libre en ng/ml de la curva estándar.
4. Aquellos valores obtenidos de muestras diluidas deberán ser convertidos aplicando el correspondiente factor de dilución en los cálculos.

Ejemplo de Curva Standard

	OD 450 nm	Conc. pg/mL
Std 1	2.762	0
Std 2	1.528	0.15
Std 3	0.903	1.5
Std 4	0.468	8
Std 5	0.140	25
Std 6	0.075	60

VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local. Los siguientes valores de Testosterona Libre pueden ser utilizados solo como guía:

	Edad	Conc. Rango
Hombres	Adulta	5 - 30
Mujeres	Adulta	0 - 3
Niños	1 - 10	0.1 - 1.25

PERFORMANCE

1. Correlación con un kit ELISA de referencia:

Un total de 74 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit ELISA y otro kit de referencia. La curva de regresión lineal fue calculada de la siguiente manera:

$$Y = 1.1x + 0.111, r = 0.97$$

2. Precisión:

Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estándar	Coefficiente de Variación (%)
1	24	1.62	0.093	5.76
2	24	7.47	0.439	5.88
3	24	14.03	0.692	4.93

Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estándar	Coefficiente de Variación (%)
1	16	1.71	0.117	6.87
2	16	7.67	0.288	3.75
3	16	14.67	0.908	6.19

3. Sensibilidad:

La sensibilidad de esta prueba resulta de calcular la media más dos desvíos estándar del punto de estándar cero, veinte veces en la misma prueba.

Suero	No. de Replicas	Media pg/ml	Desvío Estándar	Media + 2SD (Sensibilidad) pg/ml
Zero standar	20	0.014	0.022	0.057

La reactividad cruzada al anticuerpo calculada al método del 50%, de acuerdo con Abraham, se exhibe en el siguiente cuadro:

Analito	% Reactividad Cruzada
Testosterona	100
Androstenediona	<0.1
Cortisona	<0.1
Androsterona	<0.1
DHEA-S	<0.1
Cortisol	<0.1
17β Estradiol	<0.1
Estrona	<0.1
Prednisona	<0.1
Norgestrel	<0.1
17β Ethynilestradiol	<0.1

REFERENCIAS

1. McCann D, Kirkish L. Evaluation of Free Testosterone in serum. J.Clin. Immunoassay 1985; 8:234-236.
2. Ekins R.P. Free hormones in blood J. Clin. Immunoassay 1984; 7(2): 163-180.
3. Paulson JD, et al. Free Testosterone concentration in serum: elevation is the hallmark of hirsutism. Am.J.Obst. Gynecol 1977; 128:851-857.
4. Odland V, et al. Plasma androgenic activity in women with acne vulgaris and in healthy girls before, during and after puberty. Clin Endocrinology 1982; 16:243-249.
5. Green PJ. Free Testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis Clin. Chem. 1982; 28: 163-180.
6. Wu Ch. Plasma free and protein-bound testosterone in hirsutism. Obstet Gynecol 1982; 60: 188-194.
7. Abraham, G.E. (1989) Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17β. J. Clin. Endocr. Metab. 29, 866-870.

Rev. 05-2020

Anexo 4. Inserto de Globulina fijadora de hormonas sexuales.

que se une a las dos hormonas sexuales: andrógenos y estrógenos. Otras hormonas esteroideas como la progesterona, el cortisol y otros corticosteroides están unidas por la transcortina.² SHBG se encuentra en todos los vertebrados, excepto en las aves. La SHBG es producida principalmente por el hígado y se libera al torrente sanguíneo. Otros sitios que producen SHBG incluyen el cerebro, el útero, los testículos y la placenta.²

Principio de Medición

Este ensayo se basa en el método sandwich de un solo paso. La muestra, las micropartículas recubiertas con Anti-SHBG y la Anti-SHBG unida a enzimas se combinan. Durante la incubación, el SHBG presente en la muestra puede reaccionar simultáneamente con los dos anticuerpos, lo que hace que el SHBG se interponga entre las micropartículas y los anticuerpos ligados a enzimas. Después del lavado, se genera un complejo entre las micropartículas, el SHBG dentro de la muestra y los anticuerpos ligados a enzimas por reacciones inmunológicas. El sustrato quimioluminiscente se agrega luego y se cataliza por este complejo, dando como resultado una reacción quimioluminiscente. La reacción quimioluminiscente resultante se mide como RLU. La RLU es proporcional a la concentración de SHBG en la muestra del paciente.

Materiales provistos

1. Calibradores

6 viales de Calibrador liofilizado A a F. La matriz es tampón MES que contiene suero bovino. Contiene conservante ProClin 300®. Reconstituya cada calibrador liofilizado con 1,0 ml de agua destilada. Permita que el material reconstituido repose durante 5 minutos. Luego invierta el calibrador para mezclarlo completamente.

2. Paquete de reactivos

Paquete de reactivos provisto listo para usar.

	50*1	100*1	100*2	100*5	50*2
Solución de micropartículas	1.2mL*1	2.3mL*1	2.3mL*2	2.3mL*5	1.2mL*2
Conjugado de enzima	5.5mL*1	11mL*1	11mL*2	11mL*5	5.5mL*2

● Solución de micropartículas

Micropartículas recubiertas monoclonales de ratón en tampón Tris-NaCl que contiene BSA (albúmina de suero bovino). Contiene conservante de azida de sodio.

● Conjugado de enzima

Anti-SHBG de ratón marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) en tampón Tris que contiene BSA (albúmina de suero bovino). Contiene conservante ProClin 300®.

Analizadores de ensayo en los que se puede utilizar el kit

- AutoLumo A2000 Plus
- AutoLumo A2000 Plus B
- AutoLumo A1000

El inmunoen ensayo de micropartículas quimioluminiscentes (CLIA Microparticles) está diseñado para usarse en Analizador de ensayo AutoLumo A2000 Plus, AutoLumo A2000 Plus B o AutoLumo A1000.

Materiales Requeridos, pero no Provistos

1. Analizador de ensayo
2. Recipiente(s) de reacción para muestra reactivo de reacción
3. Copa(s) de muestra o tubo(s) para contener muestra
4. Sustrato Quimioluminiscente

Micropartículas SHBG-CLIA

5. Sistema de lavado para el lavado de la aguja de pipeteo.
6. Tampón de lavado utilizado en el procedimiento de lavado
7. Agua destilada o desionizada

Trazabilidad Metroológica De Calibradores

El analito en los calibradores SHBG se puede rastrear hasta los calibradores de trabajo del fabricante. El proceso de trazabilidad se basa en la norma EN ISO 17511. Los valores asignados se establecieron utilizando muestras representativas de este lote de calibradores y son específicos de las metodologías de ensayo de los reactivos. Los valores asignados por otras metodologías pueden ser diferentes. Tales diferencias, si están presentes, pueden ser causadas por un sesgo entre métodos.

Advertencias y Precauciones

1. Para uso profesional solamente.
2. Siga las instrucciones de uso con cuidado. La confiabilidad de los resultados del ensayo no se puede garantizar si hay alguna desviación de las instrucciones en este manual de uso.
3. Consulte la hoja de datos de seguridad del material y la etiqueta del producto para conocer los peligros químicos que pueden estar presentes en este ensayo.
4. Maneje los materiales y desechos potencialmente contaminados de manera segura de acuerdo con los requisitos locales.
5. PRECAUCIÓN: este ensayo contiene materiales de origen animal. Los componentes bovinos se originan en países donde no se ha informado encefalopatía espongiforme bovina (EEB).
6. Algunos reactivos que contienen ProClin 300® pueden causar sensibilización por contacto con la piel, que debe evitarse al contacto con la piel. Este material y su contenedor deben desecharse de manera segura. En caso de ingestión, busque atención médica de inmediato y muestre este envase o etiqueta.
7. No fume, beba, coma o use cosméticos en el área de trabajo.
8. Use ropa protectora y guantes desechables cuando trate con muestras y reactivos. Lavarse las manos luego de las operaciones.
9. Tenga cuidado al manipular muestras de pacientes para evitar la contaminación cruzada. Se recomienda el uso de pipetas desechables o puntas de pipeta.
10. Conduzca el ensayo lejos de las malas condiciones ambientales, ejemplo, aire ambiente que contiene gas corrosivo de alta concentración, como ácido clorhídrico de sodio, alcalino, acetaldehído, etc., o que contiene polvo.
11. No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
12. No mezcle ni use componentes de kits con diferentes códigos de lote.
13. Cuando almacene los calibradores, asegúrese de que los viales estén bien sellados.
14. Asegúrese de que las micropartículas estén resuspendidas antes de cargarse en el analizador.
15. Evite formación de espuma en todos los reactivos y tipos de muestras (muestras, calibradores y controles).
16. No sustituya ningún reactivo en este kit de otros fabricantes u otros lotes.
17. Cuando se observe cualquier daño al empaque protector o cualquier cambio en el rendimiento analítico no use el kit.

Almacenamiento

1. Almacene el kit a 2-8 °C. No congelar. Evitar la luz fuerte. Cuando se almacena como se indica, todos los reactivos son estables hasta la fecha de vencimiento.
2. Refrigere el paquete de reactivos a 2-10°C durante un mínimo de 2 horas antes de su uso.
3. Almacene el paquete de reactivos sin sellar en posición vertical en el analizador o 2-10 °C por un máximo de 28 días. Después de 28 días, el paquete de reactivos debe desecharse. Una vez que se retiran del analizador, almacénelos a 2-10 °C en posición vertical.
4. Selle y devuelva los calibradores restantes a 2-8 °C inmediatamente

después del experimento, bajo qué condiciones se mantendrá la estabilidad durante 60 días.

5. Selle y regrese los calibradores reconstituidos a 2-8°C bajo las cuales se mantendrá la estabilidad durante 7 días, para un uso más prolongado, almacene los calibradores abiertos en alícuotas y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.

Muestra

1. Recolectar muestras de suero de acuerdo con las prácticas médicas correctas.
2. No utilice muestras inactivadas por calor. No use conservante de azida de sodio en las muestras.
3. No utilice muestras con contaminación microbiana evidente.
4. Los sedimentos y los sólidos suspendidos en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba, que debe eliminarse mediante centrifugación. Asegúrese de que haya tenido lugar la formación completa de coágulos en las muestras de suero antes de la centrifugación. Algunas muestras, especialmente las de pacientes que reciben tratamiento con anticoagulantes o trombolíticos, pueden presentar un aumento del tiempo de coagulación. Si la muestra se centrifuga antes de que se forme un coágulo completo, la presencia de fibrina puede causar resultados erróneos. Asegúrese de que las muestras no estén descompuestas antes de usarlas.
5. Antes del envío, se recomienda retirar las muestras del coágulo, del separador de suero o de los glóbulos rojos.
6. El procesamiento insuficiente de la muestra o la interrupción de la muestra durante el transporte puede causar resultados deprimidos.
7. Evite muestras extremadamente hemolíticas, lipémicas o turbias.
8. Tape y almacene las muestras a 18-25 °C durante no más de 8 horas, para un uso más prolongado, las muestras se deben tapar y almacenar de 2 a 8 °C hasta 48 horas. O bien, congele las muestras que deben almacenarse o transportarse durante más de 48 horas a -20°C. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación. Mezcle bien las muestras descongeladas mediante vórtice de baja velocidad o invirtiendo 10 veces. Inspeccione visualmente las muestras, si observa capas o estratificación, continúe mezclando hasta que las muestras sean visiblemente homogéneas. Después de descongelar, llevar a temperatura ambiente y mezclar bien agitando suavemente.
9. Centrifugar las muestras descongeladas que contengan glóbulos rojos o material particulado, o que tengan una apariencia brumosa o turbia, etc. antes de su uso para garantizar la consistencia en los resultados.
10. Tenga en cuenta que los niveles de interferencia de fibrina pueden estar presentes en muestras que no tienen partículas visibles o evidentes.
11. Si no se puede verificar la recolección y preparación adecuadas de la muestra, o si las muestras se han alterado debido al transporte o manejo de la muestra, se recomienda un paso de centrifugación adicional. Las condiciones de centrifugación deben ser suficientes para eliminar las partículas.
12. Para obtener resultados óptimos, inspeccione todas las muestras para detectar burbujas. Eliminar las burbujas con una punta antes de su análisis. Use una nueva punta para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.

Procedimiento de medición

1. Comprobar los materiales consumibles
 - Verifique que haya un volumen adecuado de materiales consumibles antes de realizar la prueba.
 - Consulte el manual de funcionamiento del analizador de ensayos.
2. Cargar el kit

Micropartículas SHBG CLIA

- Mezcle el contenido de los paquetes de reactivos nuevos (sin perforar) invirtiendo suavemente el paquete varias veces antes de cargarlo en el analizador. Evitar la formación de espuma en todos los reactivos. No invierta los paquetes abiertos (perforados). Si es necesario, agite suavemente para mezclar horizontalmente después de la primera carga.
 - Lea el código de barras en el paquete de reactivos automáticamente para obtener los parámetros requeridos para la prueba.
 - Si el código de barras no se puede leer en casos excepcionales, se pueden reconocer manualmente.
 - Consulte el manual de funcionamiento del analizador de ensayos.
3. Orden de pruebas
Coloque los tubos o vasos de muestra en el estante de muestra, 20 µL de muestras diluidas para cada prueba. (Las muestras se diluirán primero con el Diluyente Universal automáticamente. 8 µL de muestras de suero se pre-diluirán automáticamente con el Analizador de ensayo con 392 µL de Diluyente Universal y se mezclarán bien).
 - Cargue el bastidor de muestra e ingrese la información de muestra en la interfaz del software del sistema.
 - Seleccione "ejecutar" para comenzar la prueba, el analizador opera las pruebas automáticamente. Realiza las siguientes funciones:
 - El instrumento realiza las siguientes funciones:
 - Mueve la muestra al punto de ajuste
 - Carga un recipiente de reacción en la ruta del proceso
 - Aspira y transfiere la muestra diluida al recipiente de reacción
 - Agrega solución de micropartículas y conjugado enzimático al recipiente de reacción
 - Mezcla, incuba y lava la mezcla de reacción
 - Agrega sustrato quimioluminiscente
 - Mide la emisión quimioluminiscente para determinar la cantidad de SHBG en la muestra
 - Descarta el recipiente de reacción usado
 - Calcula el resultado
 - Consulte el manual de operación del analizador de ensayos.
 4. Calibrar la curva
 - El analizador puede leer el código de barras en el paquete de reactivos automáticamente para obtener los parámetros necesarios para la prueba.
 - Si el código de barras no se puede leer en casos excepcionales, se pueden reconocer manualmente.
 - Transfiera los calibradores a los vasos o tubos de muestra y colóquelos en el soporte de muestra. Realizar la detección de duplicados en el sistema.
 - Cargue el soporte de muestra y la información de los calibradores de entrada en la interfaz del software del sistema.
 - Seleccione "ejecutar" para iniciar la prueba y generar la curva de calibración; se requiere una calibración cada 28 días.
 - Una vez que se acepta y almacena una curva de calibración, todas las muestras posteriores pueden analizarse sin más calibración a menos que:
 - Los controles están fuera de rango después de mediciones repetidas
 - Se utiliza un kit de reactivos y un sustrato quimioluminiscente con un nuevo código de lote.
 - Más allá de la fecha de vencimiento de una curva de calibración
 - Partes importantes del analizador son reemplazadas o reparadas.
 - Consulte el manual de funcionamiento del analizador de ensayos.
 5. Diluir la muestra
Las muestras con un valor SHBG superior a 270 nmol/L pueden diluirse manualmente. La muestra de baja concentración de SHBG se usa para diluir las muestras. Después de la dilución, multiplique el resultado por el factor de dilución.
 - La concentración de la muestra después de la dilución no debe ser

inferior a 4 nmol/L.

Resultados de medición

Los resultados de la prueba de muestra son determinados automáticamente por el software del sistema. La cantidad de SHBG en las muestras se determina a partir de la producción de luz medida por medio de los datos de calibración almacenados. Consulte el manual de funcionamiento del analizador de análisis sobre los datos almacenados.

Procedimiento de control

El requisito de control recomendado para este ensayo es comprar materiales de control por separado y probarlos junto con las muestras dentro de la misma ejecución. El resultado es válido si los valores de control caen dentro de los rangos de concentración impresos en las etiquetas. Cuando un valor de control está fuera del rango especificado, puede indicar un deterioro de los reactivos o errores en la técnica. Los resultados de las pruebas asociadas pueden no ser válidos y pueden requerir una nueva prueba. La recalibración del ensayo puede ser necesaria. Se recomienda que cada laboratorio establezca su rango aceptado para garantizar el rendimiento adecuado de la prueba.

Limitaciones del Procedimiento

- Este ensayo pretende ser una ayuda para el diagnóstico clínico. Lleve a cabo este análisis junto con el examen clínico, el historial médico del paciente y los resultados de otras pruebas.
- Si los resultados son inconsistentes con la evidencia clínica, pruebas adicionales se sugiere confirmar el resultado.
- El rendimiento de esta prueba no se ha establecido con muestras neonatales.
- Este ensayo fue diseñado y validado para su uso con suero o plasma humano de muestras individuales de pacientes y donantes. Las muestras agrupadas no deben usarse ya que la precisión de los resultados de su prueba no ha sido validada.
- Esta prueba mide concentraciones dentro del rango de 0.2-270 nmol/L. Si se esperan concentraciones de SHBG por encima del rango de medición, se recomienda diluir las muestras con el Diluyente Universal, la dilución máxima es 1:9 de esta prueba, lo que permite cuantificar las muestras hasta aproximadamente 2700 nmol/L.

Intervalo de referencia Biológica

Se realizó un estudio de 397 individuos adultos normales de la población para determinar los intervalos de referencia para este ensayo, con 5% y 95% como límite utilizando el método de percentil. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango normal, que puede ser único para la población a la que sirve, dependiendo de factores geográficos, del paciente, dietéticos o ambientales.

	Muestra No.	Intervalo de referencia (nmol/L)
Hombres (17-65 años)	143	13.77-48.94
Mujeres (17-65 años)	148	24-110.07
Fase postmenopáusica	106	13.25-74.11

Características de rendimiento

1. Precisión de medida

Este ensayo está diseñado para tener una precisión dentro del ciclo de <10%. Se analizaron 2 miembros del panel basados en suero humano (1 y 2), utilizando 1 lote de reactivos, en réplicas de 10. Los datos de este estudio se resumen en la siguiente tabla.

Miembro del panel	Lote	n	Media	Precisión dentro de la corrida SD %CV
1	1	10	41.013	2.10 5.13
2	1	10	136.678	10.66 7.80

Micropartículas SHBG CLIA

Miembro de panel	Lote	n	Media	Precisión entre corridas SD %CV
1	1	30	41.26	2.74 6.64
2	1	30	134.77	13.56 10.07

Este ensayo está diseñado para tener una precisión entre corridas de <15%. Se analizaron 2 miembros del panel basados en suero humano (1, 2 y 3), utilizando 1 lote de reactivos, en réplicas de 10, una vez al día durante 3 días de prueba. Los datos de este estudio se resumen en la siguiente tabla.

Miembro de panel	Lote	n	Media	Precisión entre corridas SD %CV
1	1	30	41.26	2.74 6.64
2	1	30	134.77	13.56 10.07

2. Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica, definida como la concentración correspondiente a las URL promedio de 20 réplicas del calibrador 50 más 2 desviaciones estándar, es ≤ 0.2 nmol/L.

3. Especificidad Analítica

Reacción cruzada: este ensayo está diseñado para tener una especificidad analítica de menos de 0.2 nmol/L de reactividad cruzada con las sustancias enumeradas a continuación, a los niveles de concentración enumerados, en el diluyente del calibrador.

Sustancia	Concentración	Valor medido (nmol/L)
AFP	400ng/mL	<0.2
Cortisol	100ng/mL	<0.2
E2	3.6ng/mL	<0.2
TG	200µg/mL	<0.2
Testosterona	2000ng/mL	<0.2
Transferrina	4mg/mL	<0.2
TSH	21000µIU/mL	<0.2

Interferencia: Sin interferencia con 30 g/L de hemoglobina, 0.2 g/L de bilirrubina, 20 g/L de Intralipid.

4. Precisión de la Medición por Correlación

Se realizó un estudio en el que se analizaron muestras utilizando este ensayo y una prueba SHBG que ya estaba disponible en el mercado. Los datos fueron analizados y se resumen en la siguiente tabla.

Método de correlación	Número de Muestras	Intercepto	Inclinación	Coefficiente de Correlación
Regresión lineal	246	-6.4597	1.0051	0.9743

5. Efecto HOOK

Una muestra enriquecida con SHBG hasta 700 nmol/L da un resultado más que el último punto de calibración.

Literatura de Referencia

- Hammond GL (Sep 2011). "Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction". *Biology of Reproduction*. 85 (3): 431-41.
- Hammond GL, Bocchinfuso WP (1996). "Sex hormone-binding globulin: gene organization and structure/function analyses". *Hormone Research*. 45 (3-5): 197-201.

Anexo 5. Inserto de 17 OH Progesterona



Sistema de Prueba 17α-OH Progesterona
Código del Producto: 5225-300

1. INTRODUCCIÓN

Propósito: La determinación cuantitativa de concentración de 17-OH Progesterona en suero o plasma humano mediante un análisis de inmunoensayo enzimático de microplaca.

2.0 RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Las concentraciones séricas y plasmáticas de 17α-hidroprogesterona (17α-OHP) son útiles en el diagnóstico inicial de la hipoadrenal suprarrenal congénita (CAH) ^{1, 2}. Este error congénito del metabolismo común en lo general se caracteriza por la deficiencia en el C21-hidroxilasa enzima del sistema, y requiere terapia de reemplazo de esteroides. La adecuación del tratamiento ha sido objeto de seguimiento mediante la determinación de la concentración de cortisol 17α-OH ^{3, 4}.

La incidencia se estima en aproximadamente 1 de cada 15,000 recién nacidos y puede llegar tan alto como 1 en 1400 en los niños de Asia. El tiempo diagnóstico es útil para detectar la CAH en los recién nacidos afectados con la enfermedad, no clínicamente reconocible, pero que conducirá a la vida amenazante crisis suprarrenal en el período neonatal y para determinar la causa de los recién nacidos con genitales ambiguos. El retraso en el diagnóstico también puede llevar a más complicaciones en niños, la aceleración de maduración esquelética prematura y desarrollo de la esteroides secundarias las características sexuales en los niños varones. El tratamiento inmediato puede salvar la vida de los niños y que los niños afectados para lograr un normal crecimiento.

17P es un esteroide producido en la corteza suprarrenal y los glándulas. Es el precursor inmediato a 11-deoxicortisol (DCS), que se convierte en cortisol. Porque CPS se produce en un 21 - hidroxilación de 17P de reacción es un indicador indirecto 21-hidroxilasa. CAH se produce cuando hay una deficiencia de esta enzima. El resultado es una disminución en la conversión de 17P a CPS que bloquea la síntesis normal del cortisol. Debido a la retroalimentación de nuevo mecanismo, una disminución en el cortisol provoca un aumento en la secreción de ACTH resultante en la hipoadrenal suprarrenal. Como el 17P es convertido, será encontrado el aumento de las concentraciones de este esteroide.

Las concentraciones de 17P aumentan en la madre durante el embarazo y en la sangre fetal. Después del nacimiento, los valores disminuyen rápidamente para llegar a los valores normales en los adultos de 2 a 7 días. Por lo tanto, es aconsejable no recoger las muestras antes de los 3 días de vida. Término prematuro y enfermedad también presentar 2 a 3 veces los valores 17P en recién nacidos. Se sugiere que se debe adoptar un corte diferencial para prematuros y enfermos lactantes.

En esta método, se dispensa en un pozo de microplaca una muestra que contiene 17-OH progesterona. Un derivado de enzima etiquetada 17OH progesterona y biotinilado anti-17OH progesterona se deben añadir. Después de una incubación adecuada, la fracción de anticuerpo se separa del reactivo no unido a la enzima.

El empleo de varias referencias de la concentración del suero de 17-OH progesterona permite la construcción de un gráfico de actividad y concentración. La comparación de las respuestas de las ditas en la curva la actividad de un espécimen desconocido se puede correlacionar con la concentración de 17-OH progesterona.

3.0 PRINCIPIO

Inmunoensayo enzimático competitivo (TIPO 7).

Los reactivos esenciales requeridos para un Inmunoensayo enzimático incluyen anticuerpos, un conjugado de enzima-antígeno y un suero que contiene un antígeno nativo. Se desencadena una reacción competitiva entre el antígeno nativo y el conjugado de la enzima-antígeno por un número limitado de sitios de unión con el anticuerpo. La liberación es ilustrada por la siguiente ecuación:



$A_{C_{21}}$ = Anticuerpo (Biotinilado) (cantidad constante)

Ag = Antígeno nativo (cantidad variable)

$^{125}I-Ag$ = Conjugado enzima-antígeno (cantidad constante)

$^{125}I-AgA_{C_{21}}$ = Complejo enzima-antígeno-conjugado anticuerpo.

K_a = Tasa Constante de Asociación

K_d = Tasa Constante de Disociación

$K_{1/2}$ = Equilibrio constante.

Una reacción simultánea ocurre entre la biotina unida al anticuerpo y la estreptavidina inmovilizada en la microplaca. Después de la incubación o separación se observa este efecto de separación del anticuerpo a la fracción unida.



$Estreptavidina_{C_{21}}$ = Estreptavidina inmovilizada en el pozo.

Complejo inmovilizado = Complejo de sándwich unido a la superficie sólida.

La actividad de la enzima en la fracción unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del antígeno nativo. Mediante el uso de varios sueros de referencia con concentraciones de antígeno conocido, se puede generar una curva de respuesta de dosis, de la cual se puede hallar la concentración de antígeno desconocida.

4.0 REACTIVOS

Materiales Preconicionados:

- Calibradores de 17α-OH Progesterona - 1.0 ml - (Icono A)**
Seis (6) viales de referencias para concentración de 17-OH progesterona en niveles de 0 (A), 0.1 (B), 0.5 (C), 1.0 (D), 2.5 (E), 10 (F) en ng/ml. Almacén a 2-8°C. Un preservativo ha sido adicionado. Los calibradores pueden ser expresados en concentraciones milares (mM) multiplicado por 3.03. Por ejemplo: 1ng/ml x 3.03 = 3.03 mM.
- Reactivo Enzima 17α-OH Progesterona - 1.0 ml - (Icono B)**
Un (1) vial contiene conjugado de 17-OH progesterona (Análogo) derivado de cabra (HRP) en una proteína estabilizadora que 90%. Almacén a 2-8°C.
- Tampón de conjugado esteroide - 2.0 ml - (Icono C)**
Un (1) vial de reactivo de tampón contiene un buffer rojo, preservativo y una unidad de proteína esteroide. Almacén a 2-8°C.
- Reactivo de 17α-OH progesterona Biotina - 6.0 ml - (Icono D)**
Una (1) botella de reactivo contiene anti-17α-OH Progesterona biotinilado purificado de conejo, conjugado de BSA en tampón, citrato azul y conservante. Almacén a 2-8°C.
- Placa de estreptavidina - 96 pozos - (Icono E)**
Una micro placa de 96 pozos revestida con 1.0 µg/ml estreptavidina y empacutada en una bolsa de aluminio con un agente de secado. Almacén a 2-8°C.
- Solución de Lavado concentrada - 20 ml - (Icono F)**
Un vial que contiene un surfactante en buffer salino. Un conservante ha sido adicionado. Almacén a 2-30°C.
- Solución sustrato - 100 ml - (Icono G)**
Una (1) botella que contiene tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en buffer. Almacén a 2-8°C.

- Solución de parada - 8 ml - (Icono H)**
Una (1) botella que contiene un ácido fuerte (0.5M H₂SO₄) Almacén a 2-30°C.

1. Instrucciones del producto.

- Nota 1:** No use reactivos que hayan pasado la fecha de expiración.
Nota 2: Evitar la exposición prolongada al calor y la luz. Los reactivos estables son estables por 60 días cuando son almacenados de 2-8°C. La estabilidad del kit y los componentes están etiquetados en la etiqueta.
Nota 3: Los reactivos mencionados son para uno de los 96 pozos Micro placa.

4.1 Materiales requeridos (no suministrados)

- Plata(s) capaces de distribuir 25µl y 50µl con una precisión superior al 1.5%
- Dispensador(es) para las distribuciones repetidas de 0.100 ml y 0.350 ml con una precisión superior al 1.5%
- Aspirador para aspirar el conjugado a un volumen (200-1000 µl)
- Lavador de micro placa o una botella de lavado (opcional)
- Lector de micro placa con capacidad de absorción de 450nm a 620nm
- Papel absorbente para borrar los pozos de la microplaca
- Cubierta plástica o de microplaca para los pozos de incubación.
- Aspirador al vacío o vacío (opcional) para los pozos del lavado (Opcional)
- Materiales de control de calidad.

5.0 PRECAUCIONES

Para uso Diagnóstico in Vitro

No para el Uso Asesor ni Ensayos en Humanos o Animales

Todos los productos que contienen suero humano se encuentran no reactivos para el Antígeno de Superficie de la Hepatitis B, VIH 1 y 2 y anticuerpos para VIH mediante pruebas aprobadas por la FDA. No se conoce prueba que pueda ofrecer seguridad a pesar que los agentes infecciosos estén ausentes, todos los productos clínicos de humanos serán manejados como potencialmente infecciosos y capaces de transmitir enfermedades. Las buenas prácticas de laboratorio para el manejo de productos sanguíneos pueden ser encontradas en el Centro de Control de Enfermedades Instituto Nacional de Salud, "Biosseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos", 2da Edición, 1988, HHS.

La eliminación adecuada de los componentes del kit debe ser acorde con los requerimientos estatutarios y de regulación.

6.0 PREPARACIÓN Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras deben ser suero, suero o plasma heparinizado y debe recolectarse con las precauciones generales en la colección de muestras por venopunción. Para una comparación exacta para establecer los valores normales, se debe obtener una muestra de suero de la mañana debe estar en ayunas. La sangre se debe recoger por venopunción en un tubo tapa roja sin gel activo o para plasma usar un tubo que contiene heparina. Permitir que la sangre se coagule para las muestras de suero. Centrifugar la muestra para separar el suero o plasma de las células.

Las muestras pueden ser refrigeradas de 2-8°C por un periodo máximo de 5 días. Si la muestra no puede ser ensayada dentro de este tiempo, la muestra puede ser almacenada a temperatura de -30°C por hasta 30 días. Evitar volver entrar como de congelación y descongelación. Cuando ensayos en duplicado, se requiere 0.050 ml de las muestras.

7.0 CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio ensayará los controles a niveles de bajo, normal y alto para el monitoreo del rendimiento del análisis. Estos controles serán tratados como desconocidos y los valores determinados en cada procedimiento de prueba realizado. Las gráficas de control de calidad serán mantenidas para asegur el rendimiento de los reactivos suministrados. Los métodos estadísticos pertinentes serán apropiados para hallar las tendencias. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar cambio no notificado en las condiciones experimentales o degradación de los reactivos del kit. Los reactivos frescos serán usados para determinar la razón de los variaciones.

8.0 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Reactivo de Enzima de Trabajo - Estable por 1 año**
Más 0.7 ml de Reactivo enzimático de 17-OH Progesterona y adicione al vial que contiene conjugado tampón de esteroide. Almacén a 2-8°C.

- Tampón de Lavado**
Diluir el contenido de la solución de Lavado a 1000 ml con agua destilada o desionada en un contenedor de almacenamiento adecuado. Almacén a temperatura ambiente de 2-30°C hasta por 60 días.

Nota 1: No utilizar el sustrato de trabajo si se observa de color azul.
Nota 2: No use reactivos que estén contaminados o que tengan crecimiento bacteriano.

8.0 PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Antes de proceder con el análisis lave todos los reactivos, suero de referencia y controles a temperatura ambiente (20-27°C).

"La prueba puede ser procesada por personal experto o por un profesional entrenado"

- Marcar los pozos de la microplaca para cada suero de referencia, control y muestras de paciente para que sean ensayados por duplicado. Regrese cualquier sisa de microplaca no usada a la bolsa de absorción, sellarla y almacenarla de 2-8°C.
- Platare 0.025 ml (25µl) de suero de referencia, control o muestra dentro del pozo asignado.
- Adicionar 0.050 ml (50µl) de solución conjugado de enzima - 17α-OH progesterona a todos los pozos.
- Agitar la microplaca suavemente por 20-30 segundos para mezclar.
- Adicionar 0.050 ml (50µl) de reactivo 17α-OH Progesterona Biotina a todos los pozos.
- Mezclar la microplaca suavemente por 20-30 segundos.
- Quitar e incubar a temperatura ambiente por 60 minutos.
- Descartar los contenidos de la microplaca por decantación o aspiración. Si se necesita desinfectar, golpear y seque la placa con papel absorbente.
- Adicionar 300µl de buffer de lavado (ver Sección Preparación de Reactivos) decantar (golpear y secar) o aspirar. Repetir dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavados. Un lavador de placa automática o manual puede ser usado. Seguir las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se usa una botella, lavar cada pozo descomponiendo los contenidos (eliminar los botadores de aire). Decantar el lavado y repetir 2 veces adicionales.
- Adicionar 100µl de solución sustrato a todos los pozos (ver Sección Preparación de Reactivos). Siempre se deben adicionar los reactivos en el mismo orden para minimizar reacciones en tiempos diferentes entre los pozos.
- NO AGITAR LA PLACA DESPUES DE LA ADICIÓN DEL SUSTRATO
- Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos.
- Adicionar 0.050ml (50µl) de solución de parada a cada pozo y mezcle suavemente de 10-20 segundos. Siempre se deben adicionar los reactivos en el mismo orden para minimizar reacciones en tiempos diferentes entre los pozos.
- Ler las absorbancias en cada pozo a 450 nm (usando una longitud de onda de referencia de 620-630 nm). Los resultados deben ser leídos dentro de los 15 minutos después de adicionar la solución de parada.

Nota: Diluya la muestra de concentraciones más altas de 20ng/ml 1:1 y 1:5 con el calibrador 17 α-OH de Progesterona 10 ng/ml o con un pool de sueros de pacientes masculinos con bajas valores conocidos de 17-OH Progesterona.

9.0 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Una curva dosis respuesta es usada para hallar la concentración de 17-OH Progesterona en muestras desconocidas.

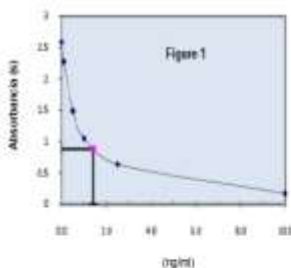
- Registrar la absorbancia obtenida del listado del lector de microplaca como se indica en el Ejemplo 1.
- Graticar la absorbancia para cada suero de referencia por duplicado versus la concentración 17 α-OH Progesterona correspondiente en ng/ml en el papel de grafica lineal (no primordial los valores de los sueros de referencia por duplicado entre los duplicados).
- Ajustar la mejor curva de a través de la unión de los puntos de la grafica.
- Determinar la concentración de 17 α-OH Progesterona para valores desconocidos, ubicando el promedio de absorbancia de los duplicados de cada valor desconocido sobre el eje vertical de la grafica, encuentre el punto de intersección en la curva y lea la concentración (en ng/ml) del eje horizontal de la grafica (los duplicados de valores desconocidos pueden ser promediados como está indicado). En el siguiente ejemplo, la absorbancia promedio (0.880) intercepta la curva dosis respuesta a la concentración (1.41 ng/ml) de 17 α-OH Progesterona. (Ver Figura 1).

Note: El software reducción de datos de computadora diseñada para (ELISA) también puede ser utilizada para la reducción de datos. Si el software es utilizado, la versión del software debe ser comprobada.

Ejemplo 1

Muestra ID	Fuente Nombre	Media Abs (A)	Media Abs (B)	Valor (ng/ml)
Cal A	A1	2.586	2.586	0
	B1	2.586		
Cal B	C1	2.276	2.275	0.1
	D1	2.274		
Cal C	E1	1.500	1.480	0.5
	F1	1.463		
Cal D	G1	1.069	1.049	1.00
	H1	1.050		
Cal E	A2	0.642	0.634	2.5
	B2	0.626		
Cal F	C2	0.172	0.169	10
	D2	0.166		
Paciente	A3	0.876	0.880	141
	B3	0.884		

* Los datos presentados en el ejemplo 1 y figura 1 son para ilustración únicamente y no deben ser usados en lugar de la curva dosis respuesta que debe ser preparada con cada ensayo.



11.0 PARAMETROS DE C. C.

Para que los resultados del análisis sean considerados válidos se deben cumplir los siguientes criterios:

1. Las absorbancias del calibrador 0 ng/ml deben ser ± 0.1 .
2. 4 de 6 grupos de control de calidad están dentro de los rangos establecidos.

12.0 ANALISIS DE RIESGOS

El MSDS y Forma de Análisis de Riesgo para este producto está disponible en la oficina de Monobind Inc.

12.1 Desempeño del análisis

1. Es importante que el tiempo de reacción en cada paso sea mantenido en forma constante para obtener resultados reproducibles.
2. El pipeteo de las muestras no se extenderá más de 10 minutos para evitar desviaciones de análisis.
3. No se deben emplear muestras altamente lipémicas, hemolizadas o contaminadas.

4. Si más de 1 placa es usada, se recomienda repetir la curva de respuesta a la costs.
5. La adición de la solución sustrato inicia una reacción química, la cual es terminada mediante la adición de la solución de parada. Por lo tanto el sustrato y solución de parada deben ser adicionados en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
6. Los lectores de placa realizan mediciones verticalmente; no tocar el fondo de los pozos.
7. La falta al remover solución adherida en los pozos de aspiración o decantación puede resultar en replicación baja y resultados inconsistentes.
8. Usar los componentes del mismo grupo no mezclar los reactivos de diferentes conjuntos.
9. Se debe realizar un pipeteo exacto y preciso, así como seguir los requerimientos de tiempo y la temperatura. Cualquier desviación de las instrucciones de uso puede anular resultados precisos.
10. Se deben seguir las buenas prácticas de laboratorio todos los estándares nacionales aplicables, regulaciones y leyes de manera estricta para asegurar el cumplimiento y uso adecuado del dispositivo.
11. Es importante calibrar todos los equipos, por ejemplo: pipetas, lectores, lavadores y instrumentos automatizados con este reactivo y realizar un mantenimiento preventivo rutinario.
12. El análisis de riesgo – como lo requiere la directiva 93/103/EEC de la marca CE (para estos y otros dispositivos elaborados por Monobind, pueden ser solicitados via Email: Monobind@monobind.com

12.2 Interpretación

1. La reacción e interpretación de resultados deben ser realizados por personal capacitado e profesionalmente entrenados.
2. Los resultados de laboratorio por sí solos son únicamente un aspecto para determinar el estado del paciente y no deben ser la única base para una terapia, particularmente si los resultados están en conflicto con otros determinantes.
3. Para validar los resultados de las pruebas, los controles adecuados y otros parámetros deben estar dentro de los rangos listados y requerimientos del ensayo.
4. Si los kits de prueba están alterados, ya sea por mezcla de partes de diferente kits, lo cual puede producir resultados de prueba falsos o si los resultados son interpretados incorrectamente, Monobind no tendrá responsabilidad.
5. Si se utiliza el sistema de reducción de datos controlados por computadora para interpretar los resultados del ensayo, es necesario que los valores de predicción para los calibradores se ubiquen dentro del 10% de las concentraciones asignadas.

13.0 VALORES ESPERADOS

Un estudio de una población adulta aparentemente normal (hombres y mujeres no embarazadas) tomada para determinar los valores esperados en el sistema de pruebas de AccuLite Rapid 17-OH ELISA detalladamente en la Tabla 1. Los niveles esperados para HCG durante un embarazo normal se lista en la tabla 2.

TABLA 1
Valores esperados para niveles de 17-OH Progesterona del Sistema de Pruebas (ng/ml.)

Hílica	Prepubertal (1-10 años)	0.2 – 0.6	0.64 – 2.54
Hombre Adulto	0.2 – 3.1	0.64 – 8.88	
Mujer Adulta	Fase Follicular: 0.20 – 1.30 Fase Luteal: 1.00 – 4.51	0.64 – 4.13 3.18 – 14.34	
Mujer Postmenopausica	0.2 – 0.9	0.64 – 2.88	

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de un rango de valores el cual puede ser esperado sea encontrado por un método dado para una población de personas "normales" depende de una multiplicidad de factores: la especificidad del método, la población probada y la precisión del método en las manos del analista. Por esta razón cada laboratorio dependiente bajo el rango de valores establecidos por el fabricante solamente hasta que se pueda determinar un rango para laboratorio por los analistas usando el método en la población local del área en la cual el laboratorio está ubicado.

14.0 CARACTERISTICAS DEL METODOD

14.1 Precisión

Las precisiones dentro y entre ensayos del sistema de pruebas de 17-OH ELISA AccuLite™ para micropalca fueron determinadas por análisis en 3 diferentes niveles de suero de control. El número, valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada uno de estos sueros controlados son presentados en la Tabla 3 y Tabla 4.

TABLA 2
Precisión dentro del Análisis (Valores en ng/ml)

MUESTRA	N	X	s	C.V.
Bajo	20	0.94	0.06	6.5%
Normal	20	3.25	0.22	6.7%
Alto	20	7.39	0.43	5.8%

TABLA 3
Precisión Entre Análisis (Valores en ng/ml)

MUESTRA	N	X	s	C.V.
Bajo	10	0.86	0.07	8.0%
Normal	10	3.12	0.24	7.7%
Alto	10	7.55	0.40	5.4%

* Medido en 10 experimentos en duplicado durante un periodo de 10 días.

14.2 Sensibilidad

El sistema de pruebas 17-OH Progesterona Monoplate de ELISA AccuLite™ tiene una sensibilidad de 0.07ng/ml. La sensibilidad fue hallada por la determinación de la viabilidad del suero calibrador 0 ng/ml usando estadística 2 σ (95% de certeza) para calcular la dosis mínima.

14.3 Exactitud

El sistema ELISA™ Monoplate de 17-OH Progesterona fue comparado con un inmunoensayo de referencia predicho. Se utilizaron muestras biológicas de una población con nivel bajo, normal y alto de 17-OH Progesterona. El rango de los valores de ± 0.75 ng/ml – 124 ng/ml. El número total de las muestras fue de 86. El último dato de la regresión de la ecuación y el coeficiente de correlación fueron computados por este método en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 4.

TABLA 4

Método	Media (X)	Último Análisis De regresión Cuadrado	Coefficiente de Correlación
Este método(y) Referencia(y)	3.49	$y=0.2232x-1.00260$	0.927
	3.19		

Sólo se observaron pequeñas desviaciones entre el sistema 17-OH Progesterona ELISA™ y el método de referencia. La ecuación de regresión cuadrada y el coeficiente de correlación indican una excelente concordancia del método.

14.4 Especificidad

El porcentaje de la reactividad cruzada de la prueba con anticuerpos de 17-OH Progesterona para sustancias relacionadas se evaluó mediante la adición de sustancias de interferencia a una matriz de suero con las siguientes concentraciones. La reactividad cruzada se calculó dividiendo el radio entre la dosis de sustancia de interferencia y la dosis de 17-OH Progesterona necesaria para producir el mismo estado de análisis.

Sustancia	Reactividad Cruzada
17-OH Progesterona	100.000
Progesterona	0.375
Androstenediona	0.158
Cortisona	0.014
Corticosterona	0.347
Cortisol	0.009
Diazolol	0.003
Dihydrocorticosterona	0.006
Sulfato DHEA	0.002
Estadiol	0.004
Estona	0.003
Estiol	0.002
Prednisona	0.023
Testosterona	0.015
RF	<0.001

15.0 REFERENCIAS

1. Skell, CA, Yoshida, T., and Lipsett, MB. Plasma progesterone and 17-OH progesterone in normal men and children with congenital adrenal hyperplasia (CAH). J Clin Invest 43:332(1969).
2. Youssef, N, Dahl R. Easy diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by measurement of 17-OH progesterone. Urologia 4:401(1975).
3. Lippe BM, Lufkin R, S.H. Lavin. In situ 17-OH progesterone, progesterone and testosterone and estradiol in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. J Pediatr 85:763(1974).
4. Atkinson OE. The application of radioisotope endocrinology to pediatric endocrinology. In Atkinson OE, editor. Pediatric Systems in Clinical Endocrinology. Basel: Mosby Decker, 473-529 (1981).
5. Alvarez MG, Benson H. Progesterone: an overview and recent advances. J Pediatr 100:1197(1981).
6. Walter PC, Pizzo CF, and Hahnley CR. Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in urine. J Clin Endocrinol Metab 47:1029-1032(1978).
7. Bock G.E, Speranz M.L., and Heltch R.P. Effect of Cortisol therapy on non-hydroxylated 17-OH progesterone in congenital adrenal hyperplasia. Clin Endocrinol 3:115(1977).
8. Dahl R.H, Foster MD. Perinatal treatment of congenital adrenal hyperplasia involving form 21-hydroxylase deficiency. J Pediatr 109:798, 1984.
9. Aquad G.P. Growth and development in the normal infant and child. J Pediatr 75.
10. Endo SD radioimmunoassay program, reactor. Biochemical Publications (1981).
11. Taitz L. <http://www.diagnosticsystems.com> (Pharmacology Web) Saunders (1974).

Revisión: 3 Fecha: 06/13/12 (DC): 0649 Cat # 5275 - 300

Reactivos	Envase	Envase (ng/ml)	Envase (ng/ml)
A1	1ml/ml	1ml/ml	
B1	11ml/ml	211ml/ml	
C1	0.7ml/ml	0.71ml/ml	
D1	3.0ml/ml	3.01ml/ml	
E1	1.00ml/ml	2.00ml/ml	
F1	11.00ml/ml	21.00ml/ml	
G1	11.00ml/ml	21.00ml/ml	
H1	11.00ml/ml	21.00ml/ml	

Para Ordenes y Consultas, por favor contacte:

Monobind Inc.
108 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92551 USA

Tel: 949-951-2800
Fax: 949-951-0518
Email: info@monobind.com
On the Web: www.monobind.com

MP (para ver más acerca de este producto) web page: www.monobind.com
análisis de riesgo de contaminación y seguridad



CE REP España#42, 3507 DR, 13/96
Tel: +34 914 519 330 300

Fuente: Inserto-17-OH-Progesterona-AccuLite-ELISA-5275-300.pdf

Anexo 6: Inserto de Androstenediona



DCM008-11
Ed. 09/2018

ANDROSTENEDIONE ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la D4-androstenediona en suero o plasma humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C - 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO008

USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de androstenediona en suero o plasma humano. El kit Androstenedione ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La androstenediona (o Δ4-androstenediona) es una hormona esteroidea, producida en las glándulas suprarrenales y en las gónadas como producto intermedio en la vía bioquímica de la síntesis de testosterona, estrona y estradiol. Es el precursor común de las hormonas sexuales masculinas y femeninas. La androstenediona secretada en el plasma puede convertirse en los tejidos periféricos en testosterona y en estrógenos. La androstenediona tiene una actividad androgénica relativamente débil, aproximadamente el 20% de la testosterona. Sin embargo, los niveles de androstenediona en suero a menudo exceden los niveles de testosterona tanto en estado sano como enfermo. Las tasas de producción y de secreción también superan a las de la testosterona, incluso en mujeres en las que hay una conversión adicional de la androstenediona a testosterona. En mujeres premenopáusicas, las glándulas suprarrenales y los ovarios sintetizan aproximadamente la mitad de la androstenediona total (aproximadamente 3 mg/día). En la menopausia, la síntesis de androstenediona es de aproximadamente la mitad, ya que hay una reducción de la síntesis por parte de los ovarios. Además, la androstenediona es el esteroide principal producido por los ovarios en la postmenopausia. La medición de la androstenediona sérica proporciona un índice de la biosíntesis de los andrógenos. Se han detectado niveles elevados de androstenediona en la hiperplasia suprarrenal congénita. Los niveles de androstenediona en suero además aumentan en caso de síndrome de ovario poliquístico y en caso de hirsutismo en mujeres. Pueden encontrarse niveles elevados de androstenediona en suero en tumores suprarrenales y ováricos.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La androstenediona (antígeno) de la muestra compete con la androstenediona antigénica marcada con peroxidasa de rabano (HRP, Conjugado) por la unión

al anticuerpo anti androstenediona adsorbido en la microplaca (fase sólida). Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida. Por último, al reaccionar con el sustrato (H₂O₂) y el Substrato TMB (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H₂SO₄). La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de androstenediona en la muestra. La concentración de androstenediona en la muestra se calcula según una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/0806-0
CAL1	REF DCE002/0807-0
CAL2	REF DCE002/0808-0
CAL3	REF DCE002/0809-0
CAL4	REF DCE002/0810-0
CAL5	REF DCE002/0811-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/0803-0

3. Conjugado (1 frasco, 21 mL)

Androstenediona conjugada con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/0802-1

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti androstenediona absorbida en la microplaca

REF DCE002/0803-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 10X (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2 M, pH 7.4 REF DCE054-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Nota

Conservar todos los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclín 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de androstenediona de 0,1 ng/mL a 10,0 ng/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de androstenediona.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren

a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.

- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Antes del uso, dejar al menos 5 minutos en el agitador giratorio.

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones de Androstenediona:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0,1	0,4	1,2	4,0	10,0

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Estables 6 meses a 2-8°C desde la apertura de los frascos.

6.2. Preparación de la muestra

La determinación de androstenediona puede realizarse en plasma o suero humano.

Si la prueba no se realiza el mismo día de la extracción, conservar la muestra a -20°C. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras.

Diluir las muestras con concentraciones superiores a 10 ng/mL (1:2) con calibrador cero.

El Control está listo para usar.

6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días.

En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.4. Procedimiento

- Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos. Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Muestra/ Control		25 µL	
Calibradores C ₀ -C ₅	25 µL		
Conjugado	200 µL	200 µL	
Incubar 1 h a +37 °C. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22+28°C), protegida de la luz.			

Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente a una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de androstenediona para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (E_m) de cada calibrador (C₀-C₅) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos estándar (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3 Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones séricas o plasmáticas de androstenediona se incluyen en los siguientes intervalos:

		ng/mL
MUJERES	fase folicular	0,75 - 3,1
	fase lútea	0,94 - 3,2
HOMBRES		0,60 - 2,7

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado

por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es $\leq 10,0\%$.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 9,5\%$.

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 0,4 – 0,8 – 1,6 – 3,2 ng/mL de androstenediona ha dado un valor medio (\pm DE) de 100,91% \pm 5,61%.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 - 16 veces dió una media (\pm DE) de 107,18% \pm 3,03%

10.3. Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según Abraham:

Androstenediona	100 %
5 α -dihydrotestosterona	0,05 %
DHEA	0,05 %
Epitestosterona	0,04 %
DHEA-S	0,027 %
Cortisol	0,008 %
Progesterona	0,007 %
Estrona	0,007 %
Testosterona	< 0,001 %
17 β -Estradiol	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Aldosterona	< 0,001 %

10.4 Sensibilidad

La concentración mínima de androstenediona que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0,01 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

10.5 Correlación

El kit Androstenedione ELISA (Dia.Metra) se ha comparado con un método quimioluminiscente disponible en el mercado. Se han comprobado 60 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$Y = 0,92 \cdot X - 0,02$$

$$r = 0,84$$

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Judd. H. Yen S. J.Clin. Endocr. & Metab., 36, 475 (1973)
2. Abraham G, J. Clin. Endoc. & M. 39,340 (1974)
3. Hillier S. G. and De Zwart F.
4. 79th Year book Medical Publishers Inc. Chicago (1985)
5. Venturoli S. et al Aspects in Adolescence with Menstrual Irregularities Fertility and Sterility, 48 (1), 78 (1987)
6. Venturoli S. et al Hormone Res., 24,269 (1986)

Ed. 09/2018

DCM008-11

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

Fuente: Inserto_Androstenediona_ELISA.pdf

Anexo 7: Inserto de Deshidroepiandrosterona sulfato (DHEAS)



**Sistema de test de
Deshidroepiandrosterona sulfato
(DHEA-S)
Código del producto: 5125-300**

1.0 INTRODUCCIÓN

Uso: La determinación cuantitativa de la concentración de deshidroepiandrosterona sulfato en suero o plasma humano mediante inmunoensayo enzimático de microplaca.

2.0 RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El suero de deshidroepiandrosterona (DHEA-S) es el principal esteroide C19 secretado por la corteza suprarrenal, y es un precursor en la síntesis de testosterona y estrógeno. DHEA-S, el ester de sulfato de DHEA, se deriva a partir de precursoros sulfatados y por la conversión enzimática del DHEA en los tejidos suprarrenales y estradales. Debido a la presencia de un 17-oxo (en lugar de hidroxilo) grupo, DHEA-S posee una actividad androgénica relativamente débil, que para DHEA no sulfatado se ha estimado en ~ 10% de la testosterona. Sin embargo, la actividad de DHEA-S se puede aumentar por sus concentraciones relativamente altas de suero, aproximadamente 100 veces mayor a 1000 DHEA o testosterona, y su débil actividad por la globulina fijadora de hormonas sexuales.¹

El papel fisiológico de DHEA-S no está bien definido. Los niveles séricos son relativamente altos en el feto y el recién nacido, bajan durante la infancia, y aumentan durante la pubertad.²⁻⁴ Aumento de los niveles de DHEA-S durante la adolescencia pueden contribuir al desarrollo del vello sexual secundario. Niveles de DHEA-S muestran una disminución progresiva después de la tercera década de la vida [5]. A diferencia de la DHEA, los niveles de DHEA-S no muestran variación diaria significativa y poca variación en el día a día. Niveles de DHEA-S no son sensibles a la administración aguda de corticosteroides,⁶ y no varían significativamente durante el ciclo menstrual normal.⁷ Esto puede ser debido a la tasa de aclaramiento metabólico más lento de DHEA-S en comparación con DHEA.⁸

La medición de suero DHEA-S es un marcador útil de la síntesis de andrógenos suprarrenales. Niveles anormalmente bajos han sido reportados en hipoadrenalismo,⁹ mientras que los niveles elevados ocurren en varias condiciones, incluyendo adenooma suprarrenal virilizante y carcinoma,¹⁰ deficiencia de 21-hidroxilasa y 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa [11] y algunas tasas de fertilidad femenina.¹² Desde muy poco el DHEA-S es producido por los glándulas.¹³ La medición de DHEA-S puede ayudar en la localización de la fuente de andrógenos en condiciones virilizantes. Los métodos para la medición de DHEA-S incluyen la cromatografía gas-líquida, de doble isotopos termica de derivación, los ensayos de unión a proteínas de la competencia, y radioinmunoensayo. Aunque la actividad cruzada significativa se produce con DHEA, androstenediona y androsterona, las concentraciones mínimas de estas sustancias que compiten en la mayoría de las muestras normales y patológicas producen un efecto mínimo en el rendimiento del ensayo.

El kit Monobind DHEA-S ELISA utiliza un anticuerpo específico anti-DHEA-S, y no requiere la extracción de la muestra antes de suero o plasma. La reactividad cruzada con otros esteroides naturales y relacionados estructuralmente es baja. El empleo de curvas de referencia del suero de la concentración conocida de DHEA-S permite la construcción de un gráfico de la actividad y la concentración. De la comparación de la curva de respuesta a la dosis, la actividad de un espécimen desconocido se puede correlacionar con la concentración DHEA-S.

3.0 PRINCIPIO

Inmunoensayo enzimático competitivo (TPO F)

Los reactivos esenciales requeridos para un inmunoensayo enzimático incluyen anticuerpos, conjugado enzima-antígeno y antígeno nativo.

Al mezclar el anticuerpo biotinilado, el conjugado enzima-antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, se produce una reacción de competencia entre el antígeno nativo y el conjugado enzima-antígeno para un número limitado de sitios de unión del anticuerpo. La interacción se ilustra por la ecuación que sigue:



Ab_{bnt} = Biotinilado anti-DHEA-S anticuerpo (Constante)
 Ag = Antígeno nativo (Cantidad variable)
 ${}^{125}\text{I}Ag$ = Conjugado Enzima-antígeno (Cantidad constante)
 $AgAb_{\text{bnt}}$ = Complejo Antígeno-anticuerpo
 ${}^{125}\text{I}AgAb_{\text{bnt}}$ = Conjugado Enzima-antígeno - Complejo anticuerpo
 K_a = Tasa constante de Asociación
 k_d = Tasa constante de disociación
 $K = k_a / k_d$ = Constante de equilibrio

Se produce una reacción simultánea entre la biotina adherida al anticuerpo y la estreptavidina inmovilizada en el microplaca. Esto permite la separación de la fracción unida del anticuerpo después de la decantación o la separación.
 $AgAb_{\text{bnt}} + {}^{125}\text{I}AgAb_{\text{bnt}} + \text{Streptavidina} = \text{Complejo inmovilizado}$
 $\text{Streptavidina} + {}^{125}\text{I}AgAb_{\text{bnt}} = \text{Complejo inmovilizado en el pozo}$
 $\text{Complejo inmovilizado} = \text{Complejo sándwich unido a la superficie sólida}$

La actividad enzimática en la fracción de anticuerpo adherido es inversamente proporcional a la concentración de antígeno nativo. Utilizando diversos sueros de referencia de concentraciones conocidas de antígeno, puede generarse una curva de respuesta a la dosis a partir de la cual se puede determinar la concentración del antígeno de una muestra desconocida.

4.0 REACTIVOS

Materiales provistos

- Calibradores de DHEA-S - 6 ml/vial - Icosos A-F**
Seis (6) viales de suero humano de concentraciones de 0 (A), 0.2 (B), 1.0 (C), 2.0 (D), 4.0 (E) y 8.0 (F) en µg/ml. Almacén a 2-8°C. Un preservante ha sido adicionado. Los calibradores pueden ser expresados en concentraciones molares (nM), multiplicando por 2.71.
Por ejemplo: 1 µg/ml x 2.71 = 2.71 nM/L.
- Reactivo enzimático de DHEA-S - 6.0 ml/vial - Icoso E**
Un (1) vial contiene DHEA-S marcado con un análogo de peroxidasa de suero en una matriz de proteína estabilizante con colorante rojo. Almacén a 2-8°C.
- Reactivo de Biotina DHEA-S - 6.0 ml/vial T**
Un (1) vial de reactivo contiene conjugado anti-DHEA-S biotinilado de IgG de conejo purificado en tampón colorante azul y conservante. Almacén a 2-8°C.
- Placa revestida de estreptavidina - 96 pocillos - Icoso B**
Una microplaca de 96 pocillos revestida con 1.0 µg/ml de estreptavidina y empacutada en una bolsa de aluminio con un agente de secado. Almacén a 2-8°C.
- Solución de lavado concentrado - 20 ml/vial - Icoso D**
Un (1) vial contiene suficiente en solución salina. Un preservante ha sido adicionado. Almacén a 2-8°C.
- Substrato A - 7 ml/vial - Icoso S**
Una (1) botella contiene tetraamilbenodina (TMB) en tampón. Almacén a 2-8°C.

- Substrato B - 7 ml/vial - Icoso S[®]**
Una (1) botella contiene tampón de hidrógeno (H₂O₂) en tampón. Almacén a 2-8°C.
- Solución de parada - 8 ml/vial - Icoso P**
Una (1) vial contiene un ácido fuerte. Almacén a 2-8°C.

- Inserto del producto**
Nota 1: No use reactivos después de la fecha de caducidad del kit.
Nota 2: Evite la exposición prolongada al calor y la luz. Una vez abierto los reactivos son estables por sesenta (60) días cuando se almacena a 5-2°C. Los componentes y estabilidad del kit están identificados en la etiqueta.
Nota 3: Los reactivos son para una microplaca simple de 96 pocillos.

- 1. Requerido pero no provisto:**
 - Pipetas capaces de distribuir 10 µl y 50 µl con una precisión de superior a 1.5%.
 - Dispensador(s) para las distribuciones repetidas de 0, 100 µl y 0.25ml volúmenes con una precisión de superior a 1.5%.
 - Dispensador (es) de volumen ajustable (200-1000µl) para conjugado.
 - Lavadora de microplacas o una botella de lavado (opcional).
 - Lector de microplacas con capacidad de absorbancia de 450 nm y 620 nm de longitud de onda.
 - Papel absorbente para retirar el exceso de los pocillos de la microplaca.
 - Cubierta plástica o de microplaca para las etapas de incubación.
 - Aspirador o vacío (opcional) para los pasos de lavado.
 - Termómetro.
 - Materiales de control de calidad.

5.0 PRECAUCIONES

Para el uso diagnóstico *in vitro*
 No para el uso interno o externo en Humanos o Animales

Todos los productos que contienen suero humano se han encontrados ser negativos para el antígeno de superficie de la Hepatitis B, VIH 1 y 2 y anticuerpos para el VHC por los reactivos licenciados por la FDA. Como ningún ensayo conocido puede detectar completa seguridad a pesar que los agentes infecciosos están ausentes, todos los productos serenos deben ser manejados como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades. Los buenos procedimientos de laboratorio para el manejo de productos sanguíneos se pueden encontrar en el Centro de Control de Enfermedades/ Instituto Nacional de Salud, "Seguridad en Laboratorios Microbiológicos y Bacteriológicos", 2da edición, 1998, el HHS publicación (no) (CDC) 88 a 8.396.

La eliminación segura de los componentes del kit debe ser de acuerdo a requerimiento regulatorio y legal local.

6.0 PREPARACIÓN Y RECOLECCIÓN DE ESPECIMENES

Los especímenes deben ser suero, suero o plasma heparinizado y se toma con las precauciones habituales en la recogida de muestras por venopunción. Para la comparación exacta para establecer los valores normales, se debe obtener una muestra de suero en la mañana en ayunas. La sangre se debe recoger en un tubo de punción venosa con línea roja superior (con o sin adyuvante de gel) o un tubo que contiene heparina para el caso de plasma. Deje que la sangre se coagule para muestras de suero. Centrifugar la muestra para separar el suero o plasma de las células.

Las muestras pueden ser refrigeradas a 2-8°C durante un periodo máximo de cinco (5) días. Si la muestra no puede ensayarse dentro de este tiempo, la muestra se puede almacenar a temperatura de -20 °C por hasta 30 días. Evite el congelamiento y descongelamiento repetitivo. Cuando se analicen por duplicado, se requiere 0.020ml del espécimen diluido.

7.0 CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio ensayará los controles en los niveles bajo, normal y alto para el monitoreo del rendimiento del análisis. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y los valores determinados en cada procedimiento de prueba realizada. Los gráficos de control de calidad deben ser mantenidos para seguir el

rendimiento de los reactivos suministrados. Los métodos estadísticos pertinentes deben ser aplicados para determinar tendencias. La desviación significativa del funcionamiento establecido puede indicar el cambio sustrato en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Los reactivos frescos se deben utilizar para determinar la razón de las variaciones.

8.0 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- 1. Buffer para lavado**
Diluya el contenido de la solución de lavado a 1000 ml con agua destilada o desionizada en un contenedor de almacenamiento adecuado. El buffer diluido puede ser almacenado a temperatura ambiente (20-30°C) hasta 60 días.
- 2. Selección sustrato de trabajo - Estable por 1 año**
Vierta el contenido del frasco de color ámbar etiquetado con Solución "W" en el frasco etiquetado con Solución clara "E". Coloque la tapa amarilla en el frasco claro para fácil identificación. Mezclar y etiquetar en consecuencia. Conservar a 2-8°C.

Nota 1: No utilice el sustrato de trabajo si se ve azul.
Nota 2: No utilizar reactivos que están contaminados o tienen el crecimiento de bacterias.

9.0 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Antes de proceder con el análisis, tenga todos los reactivos, sueros de referencia y controles a temperatura ambiente (20 - 27 °C).
**** Procedimiento de prueba debe ser realizada por una persona calificada o un profesional capacitado. ****

1. Fertilizar los pozos de la microplaca para cada calibrador, muestras de control y de pacientes para que sean ensayadas por duplicado. Desvuelva los microplacas no usadas de nuevo en la bolsa de aluminio, sulfata y almacenar a 2-8 °C.
2. Pipetear 0.010 ml (10 µl) del suero apropiado, control o espécimen en el pozo asignado.
3. Añadir 0.050 ml (50µl) del Reactivo enzimático DHEA a todos los pocillos.
4. Agite suavemente la microplaca por 20-30 segundos para mezclar.
5. Añadir 0.050 ml (50µl) reactivo Anti-DHEA biotina a todos los pocillos.
6. Agite suavemente la microplaca por 20-30 segundos para mezclar.
7. Cubrir e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Decante el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
9. Agregue 350µl de buffer de lavado (ver sección de la preparación el reactivo), decante (golpee y seque) o aspirado. Repita dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavados. Un lavador de placas automático o manual puede ser utilizado. Sigue las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si emplea una botella dispensadora, llene cada pozo presionando el empuje (levantando las botellas de aire) para dispensar el lavado. Decante el lavado y repite dos (2) veces adicionales.
10. Añadir 0.100 ml (100 µl) de reactivo de sustrato de trabajo a todos los pocillos. Siempre añadir los reactivos en el mismo orden para minimizar el tiempo de reacción.
NO AGITE EL PLATO DESPUES DE LA ADICIÓN DEL SUSTRATO
11. Incubar a temperatura ambiente durante quince (15) minutos.
12. Agregue 0.060ml (60 µl) de solución de parada a cada pocillo y mezclar suavemente durante 15-20 segundos. Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias de tiempo de reacción entre los pocillos.
13. Leer la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (utilizando una longitud de onda de referencia 620-630 nm. Los resultados deben leerse dentro de los treinta (30) minutos de la adición de la solución de parada.

Nota: Diluir las muestras sospechosas de concentraciones superiores a 8.0 µg/ml 1:5 y 1:10 con calibrador "0" µg / ml de DHEA-S o mezclas de suero de pacientes con un bajo valor conocido de DHEA-S.

10.0 CALCULO DE RESULTADOS

Una curva de respuesta a la dosis se utiliza para comprobar la concentración de DHEA-S en especímenes desconocidos.

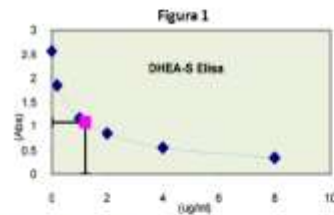
1. Registrar la absorbancia obtenida del estado del lector de microplaca tal como se describe en el Ejemplo 1.
2. Graficar la absorbancia para cada referencia de suero duplicado frente a la correspondiente concentración de DHEA-S en $\mu\text{g/ml}$ en papel milimetrado. (No promedie los duplicados de las referencias del suero antes de graficar).
3. Sacar la mejor curva que se ajuste a través de los puntos de la gráfica.
4. Para determinar la concentración de DHEA-S para un desconocido, localice la absorbancia promedio de los duplicados para cada desconocido en el eje vertical de la gráfica, el encuentre el punto de intersección de la curva, y lea la concentración (en $\mu\text{g/ml}$) desde el eje horizontal de la gráfica (los duplicados de los desconocidos pueden ser un promedio según lo indicado). En el siguiente ejemplo, el promedio de absorbancia (1.078) intersecta la curva de respuesta a la dosis en una concentración de DHEA-S (1.21 $\mu\text{g/ml}$) (Ver Figura 1).

Nota: El software de reducción de datos de computador diseñado para el ensayo de ELISA también puede ser utilizado para la reducción de datos. Si este tipo de software se utiliza, la validación del software debe ser comprobada.

EJEMPLO 1

LD	Muestra	Número de pozo	Abs (A)	Media Abs (B)	Valor (U/ml)
CAL A	A1		2.562	2.572	0.0
	B1		2.582		
CAL B	C1		1.865	1.847	0.2
	D1		1.829		
CAL C	E1		1.196	1.163	1.0
	F1		1.140		
CAL D	G1		0.855	0.850	2.0
	H1		0.848		
CAL E	A2		0.955	0.956	4.0
	B2		0.957		
CAL F	C2		0.355	0.349	8.0
	D2		0.344		
Cont 1	G2		1.784	1.780	0.62
	H2		1.780		
Pacientes	A3		1.065	1.091	1.21
	B3		1.091		

* La representación en el Ejemplo 1 y figura 1 es sólo para ilustración y no debe ser usado en lugar de una curva de respuesta a la dosis preparada con cada ensayo.



11.0 PARAMETROS DE C.C.

Para que los resultados de los ensayos sean considerados válidos deben cumplirse las siguientes criterios:

1. La absorbancia (OD) de calibrador (1 $\mu\text{g/ml}$) debe ser 2-1.3.
2. Cuatro de seis grupos de control de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos.

12.0 ANÁLISIS DE RIESGOS

El Formulario de Análisis de Riesgos y MSDS de este producto está disponible a petición de Monobind Inc.

12.1 Rendimiento de ensayo

1. Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo sea mantenga constante para lograr resultados reproducibles.

2. El pipeteo de las muestras no debe extenderse más allá de los diez (10) minutos para evitar la desviación del análisis.
3. Muestras altamente lipémicas, hemolizadas o gravemente contaminada no se deben utilizar.
4. Si se utiliza más de una (1) placa, se recomienda repetir la curva de respuesta a la dosis.
5. La adición de solución de sustrato inicia una reacción química que se termina mediante la adición de la solución de parada. Por lo tanto, la solución de sustrato y de parada debe ser añadida en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación durante reacción.
6. Los lectores de la placa miden verticalmente. No toque la parte inferior de los pocillos.
7. Si no se realiza la solución adherente adecuadamente en la aspiración o lavado por decantación podría resultar en una sobre replicación y resultados falsos.
8. Use componentes del mismo lote. No mezclar los reactivos de diferentes lotes.
9. Las muestras de pacientes con concentraciones de DHEA-S por encima de 8.0 $\mu\text{g/ml}$ se pueden diluir (1/5, 1/10 o superior) con calibrador DHEA-S V y volver a analizar. Concentración de la muestra se obtiene multiplicando el resultado por el factor de dilución.
10. El pipeteo preciso y exacto, así como siguiendo los requisitos exactos de tiempo y temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de IFU de Monobind puede producir resultados erróneos.
11. Todas las normas, regulaciones y leyes aplicables, incluyendo, pero no limitado a, los buenos procedimientos de laboratorio, deben seguirse estrictamente para garantizar el cumplimiento y el uso del dispositivo apropiado.
12. Es importante calibrar todo el equipo por ejemplo, pipetas, lectores, lavadores y/o instrumentos automatizados utilizados con este dispositivo, y llevar a cabo el mantenimiento preventivo de rutina.
13. **Riesgo Analítico:** como lo requiere la Marca CE Directiva IVD 98/79 / EC de este y otros dispositivos, hechos por Monobind, se puede solicitar a través de correo electrónico de Monobind@monobind.com

12.2 Interpretación

1. Mediciones e interpretación de los resultados deben ser realizados por una persona especializada o profesional capacitado.
2. Los resultados de laboratorio por sí solos son sólo un aspecto para determinar el estado del paciente y no deben ser la única base para la terapia, sobre todo si el resultado tiene conflicto con otros determinantes.
3. Los reactivos de este Sistema de prueba han sido formulados para eliminar al máximo las interferencias, sin embargo, el potencial de interferencia entre las muestras raras de suero y reactivos de prueba pueden provocar resultados erróneos. Anticuerpos heterofílicos pueden causar este tipo de interacciones y suelen causar problemas en los inmunoensayos (Bascato LM, Stuart MC. "Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays" Clin Chem 1989;34(7-33). Para fines de diagnóstico, los resultados de este ensayo deben utilizarse en combinación con el examen clínico, la historia del paciente, y todos los otros hallazgos clínicos.
4. Para validar los resultados de las pruebas, los controles adecuados y otros parámetros debe estar dentro de los rangos mencionados y los requisitos de ensayo.
5. Si se alteran los kits de prueba, como por ejemplo mediante la mezcla de diferentes partes de kits, lo que podría producir resultados falsos de las pruebas, o si los resultados se interpretan incorrectamente, Monobind no tendrá ninguna responsabilidad.
6. Si se utiliza la reducción de datos controlados por ordenador para interpretar los resultados de la prueba, es imperativo que los valores predichos para los calibradores estén dentro del 10% de las concentraciones asignadas.
7. Clínicamente, un valor DHEA-S por sí solo no es de valor diagnóstico y sólo debe utilizarse en conjunción con otras manifestaciones clínicas (observaciones) y procedimientos de diagnóstico.

13.0 RANGOS ESPERADOS DE VALORES

De acuerdo con los intervalos de referencia establecidos para una población "normal" de adultos, de los rangos esperados para el

sistema de prueba DHEA-S AccuBind® ELISA se detallan en la Tabla 1.

POPULACION	SANGRE ($\mu\text{g/ml}$)
Variación	0.06-4.58
Medio	0.03-5.88

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de un rango de valores que se pueden ser encontrados por un método dado para una población de personas "normales" depende de una multiplicidad de factores: la especificidad del método, la población seleccionada y la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debe depender del rango de valores esperados establecidos por el fabricante solamente hasta un rango interno que puede ser determinado por los analistas usando el método con una población selectora al área en la que se encuentra el laboratorio.

14.0 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

14.1 Precisión

Dentro y entre la precisión del análisis del sistema de prueba DHEA-S AccuBind® ELISA se determinaron por análisis tres diversos niveles de los sueros de control. El número, valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada uno de estos sueros de control se presentan en las tablas 2 y 3.

Muestra	N	X	σ	C.V.
Bajo	15	0.68	0.06	9.8%
Medio	15	1.14	0.05	4.9%
Alto	15	4.84	0.21	4.3%

Muestra	N	X	σ	C.V.
Bajo	10	0.61	0.06	9.5%
Medio	10	1.36	0.04	3.1%
Alto	10	4.73	0.16	3.4%

* Medios en diez experimentos por duplicado durante un periodo de diez días.

14.2 Sensibilidad

El sistema de prueba DHEA-S AccuBind® ELISA tiene una sensibilidad de 0.042 $\mu\text{g/ml}$. La sensibilidad se determinó mediante la determinación de la variabilidad del suero calibrador de 5 $\mu\text{g/ml}$ usando el 2 σ (95% de certeza) estadística para calcular la dosis mínima.

14.3 Exactitud

El sistema de prueba DHEA-S AccuBind® ELISA se comparó con un método de enumeración de glicocorticoides. Se utilizaron especímenes biológicos de poblaciones de bajo nivel, normales y relativamente altas DHEA-S (Los valores varían de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ - 7.7 $\mu\text{g/ml}$). El número total de estos especímenes fue de 77. La ecuación de regresión de mínimos cuadrados y el coeficiente de correlación se calcularon para DHEA-S este método en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Método	Medida	Análisis de regresión	Coefficiente de correlación
Este método (y)	1.12	$y=0.1448+0.98(x)$	0.903
Referencia (x)	1.18		

Solamente pequeñas cantidades de sesgo entre este método y el método de referencia están indicadas por la cercanía de los valores medios. La ecuación cuadrada de regresión y el coeficiente de indica un acuerdo de excelente método.

14.4 Especificidad

El % de la reactividad cruzada del anticuerpo DHEA-S a sustancias seleccionadas se evaluó mediante la adición de la sustancia de interferencia a una matriz de suero a diversas concentraciones. La reactividad cruzada fue calculada deteniendo

un cociente entre la dosis de sustancia que interfería a dosis de DHEA-S necesaria para desplazar la misma cantidad de la etiqueta analógica.

Sustancia	Reactividad Cruzada
DHEA-S	1.0000
DHEA	0.0004
Androstenediona	0.0003
Dihydroandrostenediona	0.0006
Cortisone	<0.0001
Corticosterona	<0.0001
Cortisol	0.0004
Epiandrosterona	<0.0001
Enfrol	<0.0001
Estradio	<0.0001
Estirona	<0.0001
Testosterona	<0.0001

15.0 REFERENCIAS

1. Dorfman RI, Shippy RA. Androgens. John Wiley and Sons, New York, 1956, pp. 116-128.
2. Pang S, Riddick L, Hauszins, In Lubitz F (Ed): Pediatric Endocrinology, A Clinical Guide, second edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 1990, pp. 259-291.
3. De Peretti E, Forest MG. Pattern of plasma dihydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production. J Clin Endocrinol Metab. 47:572-577 (1978).
4. Lushansky G, Saenger P, Fishman K, Gattler T, Mayo D, Berg G, Dávalos-Nardí J, Reiter E. Normative data for adrenal androgenogenesis in a healthy pediatric population: age and sex-related changes after adrenocorticotropic stimulation. J Clin Endocrinol Metab. 73:74-86 (1991).
5. Zureff B, Rosenfeld RS, Stein GW, Levin J, Fukushima CK. Sex difference in twenty-four hour mean plasma concentration of dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and the DHEA to DHEAS ratio in normal adults. J Clin Endocrinol Metab 51:330-333 (1980).
6. Pang S, Lerner A, Stone E, Oberfeld S, Engle J, New M. Late-onset adrenal steroid, 3-hydroxyandrostenedione deficiency: A cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women. J Clin Endocrinol Metab. 60:428-439 (1985).
7. Lee PDK, Winter RJ, and Green OC. "Linking adrenocortical tumors in childhood: eight cases and a review of the literature". Pediatrics. 76:437-444 (1985).
8. Ritmeyer RS. "Differential suppression of testosterone and estradiol in hirsute women with the suprachiasmatic gonadotropin-releasing hormone agonist leuprolide". J Clin Endocrinol Metab. 67:651-656 (1988).
9. Beer NA, Jakubowicz DJ, Beer RM, Arocha IR, and Reiter JE. "Effects of nifedipine on glucose tolerance and serum insulin dehydroepiandrosterone sulfate levels in insulin-resistant obese and hypertensive men". J Clin Endocrinol Metab. 71:178-183 (1991).
10. Tietz NW. Textbook of clinical chemistry, 3rd ed. Philadelphia W.B. Saunders, 1994.

Revisión: 4 Fecha: 03/09/12 BCD: 0630
Código de producto: 5125-300

Para Órdenes y Consultas, por favor contacte

Monobind Inc.
188 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92650 USA

Tel: +1 949 951 2665 Email: info@monobind.com
Fax: +1 949 951 2639 Web: www.monobind.com

Por favor visite nuestra página web para conocer más acerca de nuestros interesantes productos y servicios



CEP **REP** **CEP** **REP**
CEP/REP/CEP/REP
39510B Maars, The Netherlands
www.cep/rep/4ku

Anexo 8. Inserto de la Hormona folículo estimulante FSH



FSH ELISA

Reactivo para la determinación de la hormona folículo estimulante (FSH)

INTENCIÓN DE USO

Inmunoensayo para la detección cuantitativa de la concentración para la determinación de la hormona folículo estimulante FSH en suero humano.

RESUMEN Y APLICACIÓN

FSH es una glicoproteína secretada por las células basófilas de la pituitaria anterior. Como otras glicoproteínas tal como LH, TSH y HCG, la FSH consiste en sub-unidades designadas alfa y beta. Las hormonas de este tipo tienen una sub-unidad beta que son muy similares estructuralmente, por lo que las propiedades biológicas e inmunológicas van a depender de la única subunidad beta.

Los niveles de FSH se elevan antes de la menopausia, castración y en las fallas ováricas prematuras. Los niveles de FSH pueden normalizarse a través de la administración de estrógeno que demuestra un mecanismo inverso.

Existen relaciones "anormales" entre FSH y LH, y entre FSH y estrógeno se ha asociado la anorexia nerviosa la enfermedad ovárica poliquística. A pesar de que pueden darse excepciones significativas, se dan fallas ováricas cuando hay concentraciones aleatorias de FSH excediendo 40 mIU/ml.

Por razones no entendidas plenamente, hombres oligospermicos y azoospermicos usualmente tienen niveles elevados de FSH. En caso de tumores se deprime la presencia de FSH. Altos niveles de FSH en hombres pueden encontrarse en fallas testiculares primarias o en el Síndrome de Klinefelter. Concentraciones elevadas pueden también presentarse en fallas renales, hipertiroidismo y cirrosis hepática.

DESCRIPCIÓN

FSH ELISA es un método de ensayo en fase sólida sándwich directo, las muestras diluidas con el conjugado anti-FSH-HRP se añaden a los pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal de FSH subunidad beta. FSH en el suero del paciente se une al anticuerpo monoclonal anti-FSH, un segundo anticuerpo también anti-FSH se une a la FSH. Proteínas no unidas con el conjugado HRP son lavadas por la solución de lavado. Tras la adición del sustrato, la intensidad del color es proporcional a la concentración de FSH en las muestras.

MATERIALES PROVISTOS	96 pruebas
1. Placa de 96 pozos	1
2. Reactivo de enzima conjugada	12 ml
3. 6 calibradores 0, 5, 10, 25, 50, 100 mIU/ml liofilizado	0.5 ml
4. Reactivo solución TMB	12ml
5. Solución de Frenado (2N HCl)	12ml
6. Solución buffer concentrado 20X	25ml
7. Instructivo de uso	1

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrículado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a una temperatura de entre 2°C - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo, no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipete con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este pueden dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a una temperatura de entre 2°C a 8°C por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta un mes.
3. Evite múltiples descongelamientos de la muestra.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deberán ser traídos a la temperatura ambiente (18°-25°C) antes de su uso.
2. Preparar solución de lavado a 1x adicionando 475ml de agua destilada o desionizada al frasco de (25ml a 20x)

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18°-26°C). Mezcle suavemente los reactivos antes de su uso.

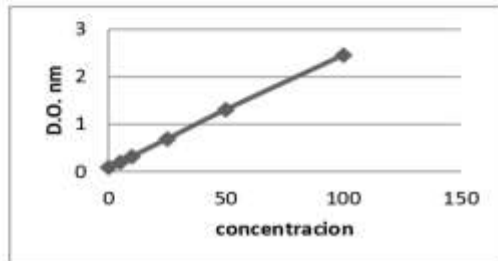
1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los micropocillos no utilizados y refrigérelos a 2-8 °C.
2. Agregue 50 µl de estándares, especímenes y controles en los pozos apropiados.
3. Agregue 100 µl de reactivo de enzima conjugada.
4. Cubra e incube a temperatura ambiente por 60 minutos (18-26°C).
5. Enjuague y lave los pocillos tres veces con 300 µl de solución de lavado de 1X. Golpee la placa de los micropocillos sobre el papel absorbente para remover las gotas de agua residuales.
6. Agregue 100 µl de sustrato TMB.
7. Incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. Frene la reacción agregando 50 µl de solución de frenado a cada pozo. Mezcle ligeramente por 30 segundos.
9. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcule los valores de absorbancia media (A450) para cada juego de estándares de referencia, control y muestras del paciente.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en IU/ml sobre el papel cuadrícula, con los valores de absorbancia sobre el eje vertical (Y) y las concentraciones sobre el eje horizontal (X).
3. Utilice el valor de absorbancia media para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de FSH en mIU/ml desde la curva estándar.

Ejemplo de curva Standard

	Conc. mIU/ml	OD 450 nm
Std1	0	0.09
Std2	5	0.20
Std3	10	0.32
Std4	25	0.69
Std5	50	1.31
Std6	100	2.46



VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local. Los siguientes valores de hCG pueden usar rangos utilizados solo como guía:

Clasificación	Rango Normal (mIU/ml)
Hombres	2.0-15
Mujeres	
Fase Lútea Folicular	2.0-10
Medio-ciclo	2.0-20
Embarazo	Menor que 2.0
Postmenopausia	Mayor que 15

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico.
2. No utilice ácido de sodio como preservante ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

PERFORMANCE

1. Correlación con un kit ELISA de referencia:

Un total de 89 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit ELISA y otro kit de referencia. Fueron obtenidos los siguientes resultados:

Correlación	Pendiente	Intercepción
0.97	0.95	0.37

2. Precisión:

Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvio Estándar	Coefficiente de Variación (%)
1	16	9.6	0.6	6.3
2	16	21.8	1.22	5.6
3	16	49.6	3.3	6.7

Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvio Estándar	Coefficiente de Variación (%)
1	16	9.2	0.63	6.8
2	16	20.9	1.33	6.4
3	16	50.5	3.12	6.2

EL PUNTO DE LAVADO DE MICROPOZOS ES CRÍTICO YA QUE UN POBRE LAVADO DARÁ COMO RESULTADO IMPRECISIÓN O LECTURA ELEVADA FALSA DE LA PRUEBA.

3. Sensibilidad:

La sensibilidad de esta prueba fue al calcular la media más dos desvíos estándar del punto de estándar cero, veinte veces en la misma prueba.

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvio Estándar	Media + 2SD (Sensibilidad)
Zero Standard	20	0.102	0.122	0.353

4. Recuperación:

Cantidades controladas de FSH fueron agregadas al suero con una baja concentración de FSH.

Valor Esperado (mIU/ml)	Recupero (mIU/ml)	Porcentaje de recupero
49	54	110
89	87	98

5. Linealidad:

Suero	Valor Original (mIU/ml)	Porcentaje de Recupero		
		1.2	1.4	1.8
1	94.7	112	115	96
2	29	95	93	103

REFERENCIAS

1. Qiu Q; Kuo A; Todd H; Dias JA; Gould JE; Overstreet JW; Lasley BL. Enzyme immunoassay method for total urinary follicle-stimulating hormone (FSH) beta subunit and its application for measurement of total urinary FSH. *Fertil Steril* 1998; 69(2):278-85.
2. Ulloa-Aguirre A; Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update* 1998; 4(3): 260-83.
3. Desai MP; Khalkhatay MJ; Sankolli GM; Joshi UM. Importance of selection of separation system in the development of enzyme immunoassay: an experience with follicle stimulating hormone (FSH) assay. *J Immunoassay*, 12(1):83-98 1991.
4. Nordin BE; Morris HA; Need AG; Horowitz M; Robertson WG. Relationship between plasma calcium fractions, other bone-related variables, and serum follicle-stimulating hormone levels in premenopausal, perimenopausal, and postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163(1 Pt 1): 140-5.
5. Rose MP. Follicle stimulating hormone international standards and reference preparations for the calibration of immunoassays and bioassays. *Clin Chim Acta* 1998; 273(2):103-17.
6. Popovic V; Micic D; Damjanovic S; Calovic L; Rolovic Z; Mijovic A; Petakov M; Manojlovic D; Micic J. Further evidence for differential regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH): increased FSH and decreased LH levels in a patient with familial pure gonadal dysgenesis. *Postgrad Med J* 1992; 68(805):925-7.

Anexo 9. Inserto de la Hormona luteinizante LH



Sistema de Prueba Hormona Luteinizante (LH)
Código de Prueba: 625-300

1.0 INTRODUCCIÓN

Uso Previsto: La Determinación cuantitativa de la Concentración de Hormona Luteinizante en Suero Humano por ensayo inmunoenzimático en microplaca.

2.0 RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

La Hormona Luteinizante (LH) es una glicoproteína conformada por 2 subunidades con un peso molecular de 30,000 daltons. La subunidad α es similar a las hormonas pituitarias [hormona folículo estimulante (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica (CG)], mientras que la subunidad β es única. La subunidad β confiere la actividad biológica a la molécula. La subunidad α está formada por 89 aminoácidos mientras que la subunidad β contiene 129 aminoácidos. El contenido de carbohidratos está entre 15% y 30%.

La utilidad clínica de la medición de la hormona luteinizante (LH) en determinar la homeostasis de regulación de la fertilidad vía eje hipotálamo - hipófisis - gónadas ha sido bien establecido (1,2). Además, la llegada de la tecnología de fertilización in Vitro (IVF) para resolver problemas asociados a la infertilidad ha proporcionado el ímpetu para el rápido avance en la metodología de ensayos para LH de la demanda clínica de bioensayos (3) a los procedimientos simples y rápidos de los ensayos inmunoenzimáticos.

En este método, el calibrador de LH, la muestra del paciente o control es primero adicionado cubierta con streptavidina. Los anticuerpos monoclonales marcados con biotina y marcado con enzima [dirigidos contra los epítopos distintos y diferentes de LH] son adicionados y los reactivos mezclados. La reacción entre varios anticuerpos de LH y las formas LH nativos forman complejos en sándwich que se unen a la streptavidina que cubre los pozos.

Después de completar el período de incubación requerido, el anticuerpo enzimático de la de Hormona Luteinizante es separado del no unido por aspiración o decantación. La actividad de la enzima presente en la superficie del pozo es cuantificada por reacción con sustratos adecuados para producir color.

El empleo de varios sueros de referencias de niveles conocidos de Hormona Luteinizante, permiten la construcción de una curva dosis respuesta de actividad y concentración. Desde la comparación a la curva dosis respuesta, la actividad de una muestra desconocida puede correlacionarse con la concentración de Hormona Luteinizante.

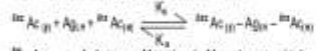
3.0 PRINCIPIO

Ensayo Inmunoenzimático (TIPO 3)

Los reactivos esenciales requeridos para un ensayo inmunoenzimático incluyen alta afinidad y especificidad de

los anticuerpos [enzima conjugada e inmovilizada], con diferentes y distintos reconocimientos de epítopos, en exceso y el antígeno nativo. En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo sobre la superficie de los pozos de la microplaca a través de la interacción de streptavidina que cubre el pozo y el anticuerpo anti-LH monoclonal marcado con biotina agregado *exogenamente*.

Luego de mezclar el anticuerpo monoclonal marcado con biotina, el anticuerpo marcado con enzima y un suero que contiene antígeno nativo, la reacción resultante entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia u obstáculo estérico, forman un complejo soluble tipo sándwich. La interacción es ilustrada por la siguiente ecuación:



${}^{125}\text{I}Ac_{1E}$ = Anticuerpo Monoclonal Marcado con biotina (Cantidad en exceso)

Ag_{1H} = Antígeno nativo (Cantidad variable)

${}^{125}\text{I}Ac_{1H}$ = Anticuerpo marcado por la enzima (Cantidad en exceso)

${}^{125}\text{I}Ac_{1H}-Ag_{1H} - {}^{125}\text{I}Ac_{1E}$ = Antígeno-Anticuerpo complejo en sándwich

K_a = Tasa Constante de Asociación

K_d = Tasa Constante de Disociación

Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la reacción de alta afinidad de la streptavidina y el anticuerpo marcado con biotina. Esta reacción es ilustrada como sigue:



Estreptavidina_B = Streptavidina inmovilizada en el pozo
Complejo inmovilizado = Complejo sándwich unido al pozo

Después que el equilibrio se mantiene, la fracción unida al anticuerpo es separada del antígeno no unido por decantación o aspiración. La actividad de la enzima en la fracción unida al anticuerpo es directamente proporcional a la concentración antígeno nativo. Mediante la utilización de varias referencias sinicas con valores de antígenos conocidos, una curva dosis respuesta puede ser generada en la cual la concentración de antígeno de una muestra desconocida puede ser hallada.

4.0 REACTIVOS

Materiales suministrados

A. Calibradores de LH - 1mVial - Icono A-F

6 viales de referencia para el Antígeno LH a niveles de 0 (A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 100 (E) y 200 (F) mIU/ml. Almacén de 2-8°C. Un preservante ha sido adicionado.

Nota: Los calibradores basados en suero humano fueron calibrados usando una preparación de referencia, la cual fue ensayada contra la OMS RP (6844).

B. Reactivo de Enzima LH 15 mVial - Icono B

Un (1) vial que contiene un anticuerpo IgG monoclonal altamente purificado marcado con enzima y biotina, un buffer, colorante y preservante. Almacén de 2-8°C.

C. Microplaca cubierta de streptavidina- 96 pozos - Icono C

Una microplaca de 96 pozos cubierta con streptavidina y empaquetada en una bolsa de aluminio con un agente desecante. Almacén de 2-8°C.

D. Concentrado de Solución de Lavado- 20 ml - Icono D

Un vial que contiene un surfactante en suero salino tamponado. Un preservante ha sido adicionado. Almacén de 2-30°C.

E. Sustrato A - 7 mVial - Icono S^A

Una (1) botella que contiene tetrametilbenzidina (TMB) en buffer. Almacén de 2-8°C.

F. Sustrato B - 7 mVial - Icono S^B

Una (1) botella que contiene peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en buffer. Almacén de 2-8°C.

G. Solución de parafén - 6mVial - Icono S^{PC}

Una (1) botella que contiene un ácido fuerte (HCl 1N). Almacén de 2-30°C.

H. Instrucciones del Producto

Nota 1: No usar reactivos más allá de la fecha de expiración.

Nota 2: Evite la exposición prolongada al calor y a la luz. **Los reactivos abiertos son estables por 60 días cuando son almacenados a 2-8°C. La estabilidad del kit y sus componentes están identificados en la etiqueta.**

Nota 3: Todos los reactivos vienen para una microplaca de 96 pozos.

4.1 Requeridos que no suministrados:

1. Pipeta(s) de 50µl con una precisión superior al 1.5%
2. Dispensador(es) para las distribuciones repetidas de 0.100 ml y 0.350ml con una precisión superior al 1.5%.
3. Lavador de microplaca o una botella de lavado (opcional).
4. Lector de microplaca con capacidad de absorbancia de 450nm a 620nm.
5. Papel absorbente para secar los pozos de la microplaca.
6. Cubierta plástica o de microplaca para los pasos de incubación.
7. Aspirador al vacío o vacío (opcional) para los pasos del lavado.
8. Cronómetro
9. Materiales de control de calidad.

5.0 PRECAUCIONES

Para el uso Diagnóstico in Vitro
No para el Uso Interno al Externo en Humanos o Animales

Todos los productos que contienen suero humano se encontraron no reactivos para el Antígeno de Superficie de la Hepatitis B, VIH 1 y 2 y anticuerpos para VHC por los reactivos licenciados por la FDA. No se conocen pruebas que puedan ofrecer seguridad a pesar que los agentes infecciosos están ausentes, todos los productos sanguíneos de humanos serán manejados como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades. Los procedimientos de laboratorio excelentes para el manejo de productos sanguíneos pueden ser encontrados en el Centro de Control de Enfermedades/ Instituto Nacional de Salud, "Seguridad en Laboratorios Microbiológicos y Serológicos", 2da Edición, 1988, HHS Publicación 1F (CDC) 88-0356.

La Eliminación Segura de los componentes del kit debe requerirse de acuerdo a la regulación local y a los requerimientos estatutarios.

6.0 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN

Se deben emplear las precauciones en la recolección de muestras por punción venosa para las muestras de suero o sangre. Para la cooperación exacta de los valores normales establecidos, una muestra de suero por la mañana en ayunas debe ser obtenida. La sangre será recogida en un tubo de punción venosa con tapa roja sin aditivos o anticoagulantes. Permitir que la sangre coagule. Centrifugar la muestra para separar el suero de las células.

Las muestras pueden ser refrigeradas de 2-8°C por un período máximo de cinco (5) días. Si la muestra no puede ser procesada dentro de este tiempo, la muestra puede ser almacenada a temperatura de -20°C hasta por 30 días. Evitar el congelamiento y descongelamiento repetitivos. Cuando se realiza el ensayo por duplicado se requieren 0.100ml de muestra.

7.0 CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio ensayará los controles en los rangos de niveles bajo, medio y alto para el monitoreo del desempeño del ensayo. Estos controles serán tratados como desconocidos y los valores determinados durante cada procedimiento de prueba realizado. Las gráficas de control de calidad serán mantenidas para evaluar el rendimiento de los reactivos suministrados. Los métodos estadísticos pertinentes serán empleados para determinar las tendencias. Una desviación significativa frente al rendimiento establecido previamente, puede indicar cambio no

notificado en condiciones experimentales o degradación de los reactivos del kit. Reactivos nuevos deberán ser usados para determinar la razón de las variaciones.

8.0 PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. Buffer para Lavado

Disuolva los contenidos del Concentrado de Lavado a 1000 ml con agua destilada o desionizada en un contenedor de almacenamiento adecuado. Almacénar a temperatura ambiente de 2-30°C hasta por 60 días.

2. Solución de Sustrato de Trabajo

Vierta los contenidos del vial ámbar de solución marcada con "A" dentro del vial claro marcado como Solución "B". Sítale la tapa amarilla sobre el vial claro para fácil identificación. Mezclar y marcar adecuadamente. Almacénar de 2-8°C.

Nota 1: No use el sustrato de trabajo si este es de color azul.

Nota 2: No use los reactivos que estén contaminados o que tengan crecimiento bacteriano.

9.0 PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Antes de proceder con el análisis libere todos los reactivos, las referencias sinicas y los controles a temperatura ambiente (20-27°C). **"El procedimiento de la prueba debe ser desarrollado por personal experto o profesionales entrenados"**

1. Marcar los pozos de la microplaca para cada suero de referencia, control y muestra del paciente para ensayos por duplicado. **Guardar cualquier tira de la microplaca no usada dentro de la bolsa de aluminio, sellar y almacenar de 2-8°C.**
2. Pipetar 0.050 ml (50µl) del suero de referencia apropiado, control o muestra dentro del pozo asignado.
3. Adicionar 0.100ml (100µl) de Reactivo de Enzima de LH a todos los pozos.
4. Agitar la microplaca ligeramente por 20-30 segundos para mezclar y cubrir.
5. Incubar 60 minutos a temperatura ambiente.
6. Decantar los contenidos de la microplaca por decantación o aspiración, si es por decantación, secar la placa con papel absorbente.
7. Adicionar 350µl de buffer de lavado (ver Sección Preparación de Reactivos) [dejar gotear y secar] o aspirar. Repetir dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavados. **Un lavador de placa automática o manual puede ser usado. Seguir las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se utiliza una botella de lavado, llenar cada pozo y evitar la formación de burbujas de aire. Decantar el lavado y repetir dos (2) veces adicionales.**
8. Adicionar 0.100 ml (100µl) de solución de sustrato de trabajo a todos los pozos (ver Sección de Preparación del Reactivo). **Siempre adicione reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.**
9. **NO AJITAR LA MICROPLACA DESPUES ADICIONAR DE SUBSTRATO**
10. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
11. Adicionar 0.350 ml (350µl) de solución de parafén a cada pozo y mezclar ligeramente (por 15-20 segundos). **Siempre adicione reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.**
12. Leer la absorbancia en cada pozo a 450 nm (usando un litro de referencia de 620-630 nm para minimizar las imperfecciones del pozo) en un lector de microplaca. **Los resultados serán leídos dentro de los treinta (30) minutos de adicionar la solución de parafén.**

10.0 CALCULO DE RESULTADOS

Una curva dosis respuesta es usada para determinar la concentración de la hormona luteinizante LH de muestras desconocidas.

1. Registrar la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas como su muestra en el Ejemplo 1.
2. Graficar la absorbancia para cada suero duplicado de referencia versus la concentración LH correspondiente en mIU/ml sobre papel de gráfica lineal (no promediar los duplicados del suero de referencia antes de la gráfica).
3. Trazar la mejor curva fija a través de los puntos de la gráfica.
4. Para determinar la concentración de LH para una muestra desconocida, localizar la absorbancia promedio de los duplicados para cada desconocido sobre el eje vertical del

gráfico, encontrar el punto de intersección de la curva y leer la concentración (en mIU/ml) del eje horizontal de la gráfica (los duplicados del desconocido pueden ser promediados como se muestra). En el siguiente ejemplo, la absorbancia promedio (1.005) intercepta la curva de dosis respuesta en una concentración de LH de 42.7 mIU/ml (ver figura 1).

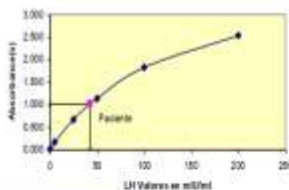
Nota 1: El software de reducción de datos diseñado para análisis ELISA puede ser usado para la reducción de datos. Si se utiliza un software, la reducción del software debe ser controlada.

EJEMPLO 1

Muestra	LD	Número de Puntos	Abs (A)	Media Abs (B)	Valor (mIU/ml)
Cal A	A1	0.909	0.009	0	
	B1	0.909			
Cal B	C1	0.161	0.162	5	
	D1	0.163			
Cal C	E1	0.677	0.662	25	
	F1	0.647			
Cal D	G1	1.155	1.130	50	
	H1	1.106			
Cal E	A2	1.852	1.825	100	
	B2	1.797			
Cal F	C2	2.596	2.534	200	
	D2	2.512			
Cal 1	E2	0.077	0.072	1.5	
	F2	0.067			
Cal 2	G2	0.582	0.575	20.5	
	H2	0.568			
Paciente	A3	0.998	1.005	42.7	
	B3	1.112			

Los datos presentados en el Ejemplo 1 y Figura 1 son ilustrativos únicamente y no deben ser usados en lugar de una curva de dosis respuesta procesada para cada ensayo.

Figura 1



10.0 PARAMETROS DE C.C.

Con el fin de que los resultados del ensayo sean considerados válidos se deben cumplir los siguientes criterios:

1. La absorbancia [D] del calibrador I' deberá ser ≥ 1.3
2. Cuadro de seis grupos de control de calidad deberán estar dentro de los rangos establecidos.

12.0 ANÁLISIS DE RIESGOS

Las Actas de seguridad (MSDS) y el Análisis de Riesgo de este producto están disponibles por requerimiento a Monobind Inc.

12.1 Desempeño del ensayo

1. Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo sea sostenido en forma constante para resultados reproducibles.
2. El pipeteo de las muestras no se extenderá más de 10 minutos para evitar derivaciones.
3. No se deben emplear muestras altamente lipólicas, hemolizadas o coaguladas.
4. Si más de 1 placa es usada, se recomienda repetir la curva dosis respuesta.

5. La adición de la solución sustrato inicia una reacción química, la cual es terminada por la adición de la solución de paralización. Por tanto, la adición de los substratos y la solución de detención serán adicionadas en la misma secuencia para eliminar cualquier derivación durante la reacción.
6. Los lectores de placa deben verificarse. No tocar el fondo de los pozos.
7. La tala en remover la solución adherente adecuadamente en los pozos de aspiración o lavado por descartación puede resultar en una pobre replicación y resultados falsos.
8. Usar componentes del mismo lote. No mezclar los reactivos de diferentes lotes.
9. Es esencial un pipeteo preciso y escrito así como seguir el tiempo exacto y la temperatura seguida. Cualquier derivación de las instrucciones de uso puede ampar resultados inexactos.
10. Se deben seguir las buenas prácticas de laboratorio todos los estándares nacionales aplicables, regulaciones y leyes de manera correcta para asegurar el cumplimiento y uso adecuado del dispositivo.
11. Es importante calibrar todos los equipos, por ejemplo, pipetas, lectores, lavadores y/o instrumentos automatizados con este reactivo y realizar un mantenimiento preventivo rutinario.
12. El análisis de riesgo – como lo requiere la directiva MD 9679EC de la marca CE- para estos y otros dispositivos elaborados por Monobind, pueden ser solicitados vía Email: Monobind@sondains.com

12.2 Interpretación

1. Las mediciones y la interpretación de los resultados deben ser desarrollada por personas expertas o profesionales entrenados.
2. Los resultados de laboratorio por sí solos son únicamente un aspecto para determinar el estado del paciente y no deben ser la única base para una terapia, particularmente si los resultados están en conflicto con otros determinantes.
3. Para resultados de pruebas válidas, los controles adecuados y otros parámetros deben estar dentro de los rangos listados y requerimientos del ensayo.
4. Si los kits de prueba están alterados, ya sea por mezcla de partes de diferente lote, lo cual puede producir resultados de prueba falsos o si los resultados son interpretados incorrectamente, Monobind no tendrá responsabilidad.
5. Si se utiliza el sistema de reducción de datos controlado por Computador para interpretar los resultados del ensayo, es necesario que los valores de precisión para los calibradores se ubiquen dentro del 10% de las concentraciones asignadas.
6. La hormona LH es suprimida por estrógeno pero en mujeres que usan anticonceptivos orales el nivel puede estar bajo o normal. La dieta escasa y la pérdida de peso pueden conducir a concentraciones menores de gonadotropina.
7. La hormona Luteinizante depende de otros factores diferentes a la homeostasis hipofisaria. Por lo tanto, la determinación por sí sola no es suficiente para evaluar el estado clínico.

13.0 RANGOS DE VALORES ESPERADOS

Un estudio de una población adulta aparentemente normal fue tomado para determinar los valores esperados para el Sistema de Microplacas de prueba Accubind™ LH ELISA. Los valores esperados son presentados en la Tabla 1.

TABLA 1
Valores Esperados para el Sistema de Prueba LH ELISA (En mIU/ml) (RP 6840)

Mujeres	
Fase folicular	0.5 – 10.5
Ciclo menstrual	18.4 – 61.2
Fase luteal	0.5 – 10.5
Postmenopausia	8.2 – 40.8
Varones	
	0.7 – 7.4

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de un rango de valores esperado por un método dado para una población de personas "normales" depende de una multiplicidad de factores. La especificidad del método, la población probada y la precisión del método utilizado. Por estas razones, cada laboratorio dependerá de los valores establecidos por el fabricante, hasta que un rango local pueda ser determinado por el analista usando el método con una

población propia del área en la cual el laboratorio está localizado.

14.0 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

14.1 Precisión

La precisión intra e inter ensayo del Sistema de Prueba de microplaca LH Accubind™ ELISA fue determinada por análisis en 3 diferentes niveles de suero de control. El número (N), valor promedio(X), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (C.V) para cada uno de estos sueros controles son presentados en la Tabla 2 y Tabla 3.

TABLA 2
Precisión Intra ensayo (Valores en mIU/ml)

Muestra	N	X	s	C.V.%
Bajo	20	1.4	0.10	6.8%
Normal	20	21.6	0.85	3.9%
Alto	20	58.3	2.10	3.6%

TABLA 3
Precisión Inter ensayo (valores en mIU/ml)

Muestra	N	X	s	C.V.%
Bajo	20	1.6	0.12	7.8%
Normal	20	21.5	2.32	10.8%
Alto	20	55.4	5.34	9.6%

*Medido en 10 experimentos en duplicado.

14.2 Sensibilidad

El Sistema de prueba LH Accubind™ ELISA tiene una sensibilidad de 0.003 mIU/ml. Esto equivale a una muestra que contiene 0.054 mIU/ml de concentración de LH. La sensibilidad analítica (límite de detección) fue establecido por determinación de la variabilidad del calibrador "0 mIU/ml" y usando estadística: 2s (95% de confianza) para calcular la dosis mínima.

14.3 Exactitud

El Sistema de prueba LH Accubind™ ELISA fue comparado con un método de radioinmunoensayo de referencia. Las muestras biológicas de población normal y fueron analizadas muestras de mujeres embarazadas. El número total de tales muestras fue de 110. La última ecuación de regresión cuadrada y el coeficiente de correlación fueron computados para LH Accubind™ ELISA en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos son descritos en la Tabla 4.

TABLA 4

Método	Medio (X)	Análisis de la última Regresión Cuadrática	Coefficiente de Correlación
Este Método	54.8	$y = 0.081 + 0.30(x)$	0.989
Referencia	55.1		

Solamente un pequeño sesgo entre el Sistema de prueba LH Accubind™ ELISA y el método de referencia se presentan por la presencia de los valores primarios. La ecuación de regresión cuadrada última y el coeficiente de correlación indican excelente concordancia entre los métodos.

14.4 Especificidad

La reacción cruzada del Sistema de Prueba de Microplaca LH Accubind™ ELISA a sustancias seleccionadas fue evaluada por la adición de sustancias interferentes a una matriz del suero en varias concentraciones. La reacción cruzada fue calculada por denominación de un ratio entre la dosis de la sustancia interferente a la dosis de Hormona Luteinizante necesaria para producir la misma absorbancia.

Sustancia	Reacción cruzada	Concentración
Luteína (LH)	1.000	-
LH Subunidad β	<0.001	1000ng/ml
Folículoestim (FSH)	<0.001	1000ng/ml
Gonadotropina Coriónica (CG)	<0.001	1000ng/ml
Tropopona (TSH)	<0.001	1000ng/ml

15.0 REFERENCIAS

1. Kosasa T.S. "Measurement of Human Luteinizing Hormone." *Journal of Reproductive Medicine* 25, pg. 201-6 (1981)
2. Clancy H, Braunstein G.D., et al. "Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropin Concentrations and Fetal Sex Predictions." *Fertility and Sterility* 34, pg. 336-40 (1980)
3. Braunstein G.D., et al. "Serum Human Luteinizing Hormone Levels through Normal Pregnancy." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 125, pg. 678-81 (1976)
4. Goldstein D.P., and Kosasa T.S. "The Subunit Radioimmunoassay for LH Clinical Application." *Gynecology* 6, pg. 145-84 (1975)
5. Batzer F., "Hormonal Evaluation of Early Pregnancy." *Fertility and Sterility* 34, pg. 1-12 (1980)
6. Braunstein G.D., et al. "First-Trimester Luteinizing Hormone Measurements as an Aid to the Diagnosis of Early Pregnancy Disorders." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 131, pg. 25-32 (1978)
7. Lenton E., Neal L. and Sukman R. "Plasma Concentrations of Human Gonadotropin from the time of Implantation until the Second Week of Pregnancy." *Fertility and Sterility* 37, pg. 773-78 (1982)

Revisión 3 Date: 06/11/12 DCO: 0648
Cat #: 625-300

	Tamaño	90(A)	150(B)
Muestras (Hombres)	A)	1 ml set	1 ml set
	B)	1 (13 ml)	2 (13 ml)
	C)	1 placa	2 placas
	D)	1 (20 ml)	1 (20 ml)
	E)	1 (7 ml)	2 (7 ml)
	F)	1 (7 ml)	2 (7 ml)
	G)	1 (9ml)	2 (8 ml)

Para Órdenes y Consultas, por favor contáctese



Tel: +1 949.951.2665 Email: info@monobind.com
Fax: +1 949.951.3539 Web: www.monobind.com

Por favor visite nuestra página web para conocer más acerca de nuestros interesantes productos y servicios



Fuente: INSERTO_LH-ELISA.pdf

Anexo 10. Inserto de Estradiol



PROPOSITO

La determinación cuantitativa de concentraciones de Estradiol en suero o plasma humano mediante un ensayo inmunoenzimático con microplacas.

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

La medición de Estradiol en suero o plasma se considera el camino más confiable para evaluar su tasa de producción.

Estradiol (17β-Estradiol), es una hormona esteroide de peso molecular 272.37 daltons la cual circula predominantemente unida a una proteína. En adición al Estradiol, otras estrogénicas endógenas naturales incluyen hormonas secretadas principalmente por las células ováricas y también por las glándulas adrenales, cuerpo lúteo y placenta, en el hombre por los testículos. Estrógenos endógenos (naturales o sintéticos) provocan un grado de variación a todas las respuestas fisiológicas usualmente producidas por estrogénos endógenos.

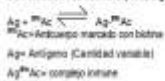
Las hormonas estrogénicas son secretadas a diferentes tasas durante el ciclo menstrual a lo largo del periodo de actividad ovárica. Durante el embarazo la placenta llega a ser la fuente principal de estrogénos. En la menopausia la secreción de estrogénos disminuye a diferentes tasas. Las gonadotropinas de la hipófisis que regula la glándula pituitaria anterior de las hormonas ováricas, estradiol y progesterona, control fisiológico de la producción de la gonadotropina hipófisiaria es regulada por la concentración de plasma de estrogénos y progesterona. Este sistema de retroalimentación completa resulta en la formación de ciclos de ovulación y menstruación. Las operaciones de estradiol han proporcionado valor en una variedad de contextos incluyendo la investigación de pubertad precoz en niñas y ginecomastia en hombres. Su principal uso ha sido en el diagnóstico diferencial de anovulaciones y en el monitoreo de la inducción de la ovulación. Este kit usa un anticuerpo anti-estradiol específico y no requiere extracción de la muestra previa de suero o plasma. La reactividad cruzada a otros estrogénos reaccionan estructuralmente y naturalmente es baja.

El empleo de sueros sueros de referencia de concentraciones conocidas de estradiol permite la construcción de una gráfica de actividad y concentración. A partir de la comparación de la curva de la respuesta la actividad de una muestra desconocida puede ser comparada con la concentración de estradiol.

PRINCIPIOS

Inmunoensayo enzimático competitivo retardado (Tipo 2)

Los reactivos esenciales requeridos para un inmunoensayo enzimático incluyen anticuerpo, conjugado suero-antígeno y antígeno nativo. Después de mezclar el anticuerpo marcado con anticógeno con un suero que contiene el antígeno, o de otro resultado una reacción del antígeno y el anticuerpo. La interacción es retardada por la siguiente ecuación:



Después de una incubación corta la enzima combinada es adicionada hasta adición saturada permite un incremento en sensibilidad para las muestras con una baja concentración. Aunque la adición del conjugado de la enzima resulta en una reacción de competición entre la enzima nativa y el antígeno en la muestra por un número limitado de sitios de unión de anticuerpos (no consumidos en la primera incubación).



$\overset{H_2O}{\text{Anticuerpo}}$ = Conjugado enzima-anticuerpo (cantidad constante)

$\overset{H_2O}{\text{Anticuerpo}}$ = Conjugado anticuerpo-conjugado en enzima antigénico

$\overset{H_2O}{\text{Anticuerpo}}$ = Anticuerpo marcado con biotina que no reacciona en la primera incubación

$\overset{H_2O}{\text{Anticuerpo}}$ = Tasa Constante de Asociación

$\overset{H_2O}{\text{Anticuerpo}}$ = Tasa Constante de Disociación

$\overset{H_2O}{\text{Anticuerpo}}$ = constante de equilibrio

Ocurre una reacción simultánea entre la enzima nativa y el anticuerpo y la enzima inactivada sobre el mismo suero. Esto afecta la separación de la fracción unida al anticuerpo después de decantación o aspiración.



$\overset{H_2O}{\text{Anticuerpo}}$ = Estradiol nativo inactivado en el pozo

$\overset{H_2O}{\text{Anticuerpo}}$ = Conjugado de estradiol unido a la superficie sólida.

La actividad de la enzima en la fracción unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de antígeno nativo. Mediante el uso de sueros sueros de referencia con concentración de antígeno conocida, se puede generar una curva de respuesta de dosis, de la cual se puede hallar la concentración de antígeno desconocido.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

A. Calibradores de Estradiol - 12 microlitros (Jeringa A-4)
 Seis (6) viales de referencia para el Antígeno de Estradiol a niveles de 0 (AL), 25 (B), 100 (C), 250 (D), 500 (E), 1000 (F) y 2000 (G) en pg/ml. Un conservante ha sido adicionado. Los calibradores pueden ser expresados en nanogramos (nM), multiplicando por 2.72. Por ejemplo: 100 pg/ml x 2.72 = 272 pM

B. Reactivo Enzima de Estradiol - 8 microlitros - Jeringa
 Un (1) vial de estradiol conjugado (antígeno) peroxidasa de rábano picante (HRP) en una matriz estabilizante de proteína con función org. Almacén a 2-8°C.

C. Puzos de látex estradiol 4 ml una botella de reactivo contiene conjugado antiestradiol (G) de conjugado retardado con biotina enlatado, latente y conservante. Almacén a 2-8°C.

D. Placa de Reactivo de Luz 96 pozos - Jeringa
 Una microplaca blanca de 96 pozos revestida con 1.0 µg/ml de estreptavidina y empaquetada en una bolsa de aluminio con un agente de secado. Almacén a 2-8°C.

E. Solución de Lavado concentrada - 25 ml - Jeringa
 Un vial que contiene un suficiente en buffer salino. Un conservante ha sido adicionado. Almacén a 2-30°C.

F. Reactivo Sustrato - 12 microlitros - Jeringa
 Una (1) botella que contiene Tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en buffer. Almacén a 2-8°C.

G. Solución de parada 8 microlitros - Jeringa
 Un vial que contiene un ácido fuerte (H₂SO₄) almacenado de 2-30°C.

H. Inserto del producto
 Nota 1: No use reactivos que hayan pasado la fecha de caducidad.
 Nota 2: Los reactivos una vez abiertos son estables durante sesenta (60) días al almacenar a 2-8°C.
 Nota 3: Los reactivos mencionados son para una microplaca de 96 pozos.

Materiales requeridos (no suministrados)
 1. Pipeteador de 25 y 10 µl con una precisión superior al 1.0%.
 2. Dispensador para las distribuciones repetidas de 0.100 ml y 0.350 ml con una precisión superior al 1.5%.

1. Dispensador de volumen ajustable 200 a 1000 µl.
4. Lavado de microplaca a una botella de lavado (opcional).
5. Luminómetro
6. Papel absorbente para secado de los pozos de la microplaca.
7. Cubierta plástica con microplaca para los pozos de incubación.
8. Aspirador al vacío (opcional) para los pozos de lavado.
9. Contenedor
10. Materiales de control de calidad.

PRECAUCIONES

Para uso Diagnóstico in Vitro

No para el Uso Interno ni Externo en Mujeres o Adolescentes

Todos los productos que contienen suero humano se encuentran no reactivos para el Antígeno de Superficie de la Hepatitis B, VIH 1 y 2 y anticuerpos para VIH mediante pruebas aprobadas por la FDA. No se conoce prueba que pueda ofrecer seguridad a pesar que las agencias reguladoras están sueltas, todos los productos sueros de humanos serán manipulados como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades. Las buenas prácticas de laboratorio para el manejo de productos sanguíneos pueden ser encontradas en el Centro de Control de Enfermedades, Instituto Nacional de Salud, "Seguridad en Laboratorio Microbiológico y Bacteriológico", 2da Edición, 1988, NMS.

PREPARACION Y RECOLECCION DE MUESTRAS

Se deben emplear las precauciones en la recolección de muestras por punción venosa para las muestras de suero, plasma heparinizado o suero. Se deben obtener muestras de suero en ayunas para obtener valores normales con el fin de hacer una comparación más exacta. La sangre se recolecta por punción venosa en un tubo de tipo sra en alfileres o para plasma use tubo con heparina. Permitir que la sangre coagule. Centrifugar la muestra para separar el suero o plasma de las células. Las muestras pueden ser almacenadas a 2-8°C por un periodo máximo de 5 días. Si la muestra no puede ser ensayada dentro de este tiempo, la muestra puede ser almacenada a temperatura de -20°C por hasta 30 días. Evitar ciclos de congelación y descongelación. Cuando ensayamos en duplicado, se requieren 0.600 ml de muestra.

PREPARACION DE REACTIVOS

1. Buffer de Lavado
 Diluir los contenidos de la solución de Lavado a 100 ml con agua destilada o desionada en un contenedor de almacenamiento adecuado. Almacén a temperatura ambiente de 20-27°C hasta 60 días.

Nota: emplear sustrato de trabajo si su sustrato se está

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Antes de proceder con el análisis leve todos los reactivos, sueros de referencia y controles a temperatura ambiente (20-27°C).

1. Formar las pozos de la microplaca para cada suero de referencia, control y muestra de paciente para que sean ensayados en duplicado. Registrar cualquier tipo de microplaca no usada a la hora de almacenar, sellarla y almacenarla a 2-8°C.
 2. Pipetear 0.025 ml (25 µl) del suero de referencia, control o muestra dentro del pozo asignado.
 3. Adicionar 0.050 ml (50 µl) de Reactivo de biotina de Estradiol a cada pozo.
 4. Agitar la microplaca suavemente por 30-30 segundos para mezclar.
 5. Cubrir e Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
 6. Adicionar 0.050 ml (50 µl) de reactivo de enzima estradiol a todos los pozos.
- Adicionar directamente sobre las muestras dispensadas en los pozos
7. Agitar la microplaca suavemente por 20 a 30 segundos para mezclar.
 8. Cubrir e Incubar 90 minutos a temperatura ambiente.
 9. Decantar los contenidos de la microplaca por decantación o aspiración. Si se realiza decantación, girar y seque la placa con papel absorbente.
 10. Adicionar 350 µl de buffer de lavado (ver Sección Preparación de Reactivos, desatar (golpear y sacar) o aspirar). Repetir dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavados. Un lavador de placa automático o manual puede ser usado. Seguir las instrucciones del fabricante para ser usado. Si se usa una botella, lavar cada pozo desconectando la

contenedores (evitar los borbotones de aire). Desatar el lavador y repetir 2 veces adicionales.

11. Adicionar 0.100 ml (100 µl) de solución sustrato a todos los pozos. (Ver Sección de Preparación de Reactivos). Siempre añada los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias de tiempo de reacción entre pozos.

12. Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos.

13. Adicionar 0.50 ml (50 µl) solución de parada a cada pozo y mezclar suavemente de 15 a 20 segundos. Siempre añada los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias al tiempo de reacción entre pozos.

14. Leer las absorbancias en cada pozo a 450 nm usando una longitud de onda de referencia de 620-630 nm. Los resultados deben ser leídos dentro de los 15 minutos después de adicionar la solución de parada.

Nota: Diluir las muestras sospechosas de concentraciones mayores de 3.000 pg/ml 1:5 y 1:10 con el calibrador 0 pg/ml de estradiol o un pool a suero de pacientes masculinos con un valor bajo conocido de estradiol.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio ensayará los controles a niveles de inferior, medio y mayor nivel para el monitoreo del rendimiento del análisis. Estos controles serán tratados como desconocidos y los valores determinados en cada procedimiento de prueba realizado. Las gráficas de control de calidad serán mantenidas para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Los métodos estadísticos pertinentes serán empleados para hallar las tendencias. La desviación significante del rendimiento establecido puede indicar cambios no notificados en las condiciones experimentales o degradación de los reactivos del kit. Los reactivos frescos serán usados para determinar la razón de las variaciones.

CÁLCULO Y RESULTADOS

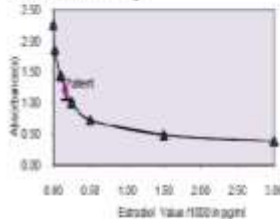
Una curva de respuesta a la dosis es usada para hallar la concentración de Estradiol en las muestras desconocidas.

1. Registrar las absorbancias obtenidas del lector de microplaca como se muestra en el Ejemplo 1.
2. Graficar las absorbancias para cada suero de referencia por duplicado versus la concentración de Estradiol correspondiente en pg/ml sobre un papel de gráfica lineal.
3. Sacar la mejor curva de ajuste a través de los puntos de la gráfica.
4. Para determinar la concentración de Estradiol para un desconocido, localizar las absorbancias promedio de los duplicados para cada desconocido en el eje vertical del gráfico, encontrar el punto de intersección de la curva y leer la concentración (en pg/ml) del eje horizontal del gráfico. (Las absorbancias de los desconocidos pueden ser promediadas como se indica). En el siguiente ejemplo, el promedio de absorbancias (1.202) del paciente muestra la curva de calibración, en una concentración de Estradiol (160 pg/ml).

EJEMPLO 1

Muestra	Numero de pacients (A) (Año Medía (B) (Valor (C) (µg/ml)		
GrA	A1 2.288	2.296	1
	B1 2.244		
GrB	C1 1.836	1.848	20
	D1 1.860		
GrC	E1 1.428	1.428	100
	F1 1.443		
GrD	G1 1.817	1.801	250
	H1 1.888		
GrE	I1 0.696	0.723	500
	J1 0.748		
GrF	K1 0.480	0.487	1500
	L1 0.493		
GrG	M1 0.380	0.388	3000
	N1 0.381		
Paciente	O1 1.202	1.202	100
	P1 1.203		

Los datos y la línea siguiente son un ejemplo únicamente. No usar para calcular sus resultados.



Nota: Multiplicar los valores del eje horizontal por 1000 para convertir a µg/ml.

PARAMETROS DE C. C.

Para que los resultados del análisis sean considerados válidos se debe cumplir las siguientes criterios:

1. Las absorbancias del calibrador (µg/ml) deben ser > a 1.3.
2. 4 de 6 puntos de control de calidad están dentro de los rangos establecidos.

ANÁLISIS DE RIESGOS

A. Desarrollo del análisis

1. Es importante que el tiempo de reacción en cada paso sea mantenido en forma constante para obtener resultados reproducibles.
2. El punto de las muestras no se extendió más de 10 minutos para evitar retrasar el análisis.
3. No se deben emplear muestras altamente lipémicas, hemolizadas o contaminadas.
4. Si más de 1 placa es usada, se recomienda repetir la curva de respuesta a la hora.
5. La adición de la solución sustrato inicia una reacción química por lo tanto el lavado y solución de placas deben ser adicionado en la misma secuencia para eliminar cualquier derivación de tiempo durante la reacción.
6. Las lecturas de placa realizan mediciones enzimáticas. No tocar el fondo de la placa.
7. La falta al remover solución sustrato en los pasos de aspiración o decantación puede resultar en replicación baja y resultados incorrectos.

8. Usar los componentes del mismo grupo no mostrar los resultados de diferentes conjuntos.
9. Es esencial un pipeteo preciso y exacto así como seguir el tiempo exacto y la temperatura adecuada. Cualquier desvío de las instrucciones de uso puede afectar resultados precisos.
10. Se deben seguir las buenas prácticas de laboratorio tales las estándares nacionales aplicables, regulaciones y leyes de manera estricta para asegurar el cumplimiento y uso adecuado del dispositivo.
11. Es importante calibrar todos los equipos, por ejemplo pipetas, lectores, lavadoras y instrumentos automatizados con este reactivo y realizar un mantenimiento preventivo rutinario.
12. El análisis de riesgo - como lo requiere la directiva 90/269/EEC de la marca CE- para esta y otros dispositivos elaborados por Monobind, pueden ser solicitados vía Email Monobind@monobind.com.

B. Interpretación

1. Los resultados de laboratorio por sí solos son únicamente un indicador para determinar el estado del paciente y no deben ser la única base para una terapia, particularmente si los resultados están en conflicto con otros determinantes.
2. Para resultados de pruebas válidas, los controles internos y otros parámetros deben estar dentro de los rangos listados y requerimiento del ensayo.
3. Si los kits de prueba están alterados, ya sea por medio de partes de diferentes kits, lo cual puede producir resultados de prueba bajos y si los resultados son interpretados incorrectamente, Monobind no tendrá responsabilidad.
4. Si se utiliza el sistema de reducción de datos controlado por Computador para interpretar los resultados del ensayo, es necesario que los valores de predicción para los calibradores se ubiquen dentro del 10% de las concentraciones asignadas.

VALORES ESPERADOS

Conforme con los intervalos de referencia establecidos para una población adulta "normal" y mujeres durante el embarazo, los rangos esperados para estradiol AutoBio-Diag son descritos en la tabla 1. Valores esperados para estradiol:

	MEDEA	RAANGO
MUJERES	-	-
PRE MENOPAUSIA	48	5-175
POST MENOPAUSIA	120	44-180
EMBARAZO	230	157-261
RESERVA DE ESTRADIOL	122	42-289
RESERVA DE ESTRADIOL	7.3	10-22
RESERVA DE ESTRADIOL	13	10-123
VARONES	16	4-74

Durante el embarazo los niveles séricos de estradiol se incrementan típicamente hasta finalizar el tercer trimestre.

Es importante guardar en mente que el establecimiento de un rango de valores el cual puede ser esperado sea influenciado por un número dado para una población de personas "normales" es dependiente de una multiplicidad de factores: la especificidad del método, la población probada y la precisión del método en la forma del análisis. Por estos motivos cada laboratorio dependerá bajo el rango de valores esperados establecido por el laboratorio solamente hasta que se pueda determinar un rango para laboratorio por los análisis cuando el método con una población local en la cual el laboratorio está ubicado.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

A. Precisión

Las precisiones dentro y entre ensayos del sistema de pruebas de Estradiol ELISATM para microplaca fueron determinadas por análisis en 3 diferentes niveles de suero de control. El número, valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada uno de estos sueros control son presentados en la Tabla 7 y Tabla 8.

TABLA 7
Precisión dentro del Análisis* (Valores en µg/ml)

MUESTRA	N	X	s	C.V.
Seco	20	85.9	7.6	8.9%
Normal	20	263.5	26.3	7.8%
Alto	20	485.3	53.7	11.2%

TABLA 8
Precisión Entre Análisis** (Valores en µg/ml)

MUESTRA	N	X	s	C.V.
Seco	12	89.3	8.3	9.3%
Normal	12	265.5	23.2	8.7%
Alto	12	487.2	58.5	12.2%

* Medido en 10 experimentos en duplicado durante 10 días.

B. Exactitud

El sistema ELISATM Monobind de Estradiol fue comparado con un método de inmunoradiación de punto (RIM) de referencia. Se utilizaron muestras biológicas de poblaciones con niveles de estradiol bajo, normal y relativamente alto (el rango de valores fue de 50pg/ml-400pg/ml). El número total de las muestras fue de 65. Los datos estadísticos se muestran en la tabla 4.

TABLA 4

Método	Medio (X)	Único Análisis De Regresión Cuadrada	Coefficiente de Correlación
Este (análisis)	138	y=10+0.95(x)	0.978
Referencia (RIM)	148		

Los pequeños coeficientes de desviación entre el sistema de Estradiol ELISATM el método de referencia de indican por la precisión de los valores medidos. La ecuación de regresión cuadrada y el coeficiente de correlación indican un excelente acuerdo del método.

C. Sensibilidad

Este sistema tiene una sensibilidad de 0.5pg/ml. La sensibilidad fue evaluada determinando la sensibilidad de controlador de suero (µg/ml) y usando lo establecido (95% certeza) para calcular la dosis mínima.

D. Especificidad

El % de especificidad medida del antisuero de estradiol para sustancias seleccionadas se evaluó mediante la adición de sustancias de interferencia a una matriz de suero con las siguientes concentraciones. La reacción cruzada se calculó dividiendo el radio entre la dosis de sustancia de interferencia y la dosis de Estradiol necesaria para desplazar el mismo cantidad del antisuero marcado.

Sustancia	Reactividad Cruzada
Androstenediona	<0.003
Dehidroepiandrosterona	0.008
Testosterona	<0.001
Androstenediol	<0.001
Androstenediona	<0.001
Androstenediona	<0.001
Androstenediona	<0.001
Androstenediona	<0.001
Androstenediona	<0.001
Androstenediona	<0.001

REFERENCIAS

1. Kaplan GC. The application of natural steroid radioimmunoassay to gynecologic endocrinology. In Kaplan GC, editor. *Reproductive Endocrinology: Clinical Endocrinology*. Basel: Hanser, 1975; 203-210.
2. Eder F. Normal evaluation of early pregnancy. *Fertility Sterility* 34:1-13 (1980).
3. Eason J. Base body temperature: available method of ovulation detection. *Fertility Sterility* 30:729-31 (1978).
4. Bergdoll C, Niles SL, Hild L. Human progestin therapy: serum estradiol and progesterone patterns during progestin cycles. *Fertility Sterility* 30:751-60 (1978).
5. Galtby J, et al. Clinical investigation of the menstrual cycle: clinical, endometrial and endocrine aspects of ultra-early. *Fertility Sterility* 35:296-305 (1981).
6. Haveligh RA, Farnell T. Copies ultra-early detection serum progesterone levels in diagnose and assessment of biopsy for recurrent and treatment abortion. *Fertility Sterility* 32:294-3 (1979).
7. Hernandez JL, et al. Direct evidence of ultra-early pregnancy in women with natural abortion. *Obstet Gynecology* 45:704-10 (1975).

8. Gidycz D, et al. Correlation between estradiol and progesterone in cycle with late phase abortion. *Fertility Sterility* 32:249-54 (1979).
9. Klapper A, Fuchs P, Poggestager, H, Fuchs P, Klapper A, editor. *Endocrinology of Pregnancy*. Hagerstown: Harper & Row, 19-122 (1977).
10. Lehmann T, Balmaceda G. The estradiol and progesterone cycle in abortion. In: *Endocrinology of Pregnancy*. Hagerstown: Harper & Row, 19-122 (1977).
11. March CM. Late phase defects. In: March CM, Daviger J, editor. *Reproductive Endocrinology: Infertility and Contraception*. Philadelphia: F. A. Davis Company, 1975; 404-75.
12. March CM, Gidycz D, Nakamura RB, Hinkel D. Role of estradiol and progesterone in eliciting the miscarriage following treatment with mifepristone (RU-486). *Obstet Gynecol Int J* 48:507-12 (1978).
13. *BC-50* endometrial evaluation program. *Reproductive Endocrinology Publications*, 1980.
14. Rajkumar S, et al. Plasma progesterone levels in normal and abnormal early human pregnancy. *Fertility Sterility* 32:328-402 (1979).
15. *Two-Test Method of Ultrasound Obstet Gynecol*. Philadelphia: W.B. Saunders, (1974).

Revista 2 Fecha: 1/2/2016 Cat# 4325-38

Lot	Mean	CV (%)
GrA	2.288	0.27
	2.244	0.26
GrB	1.836	0.26
	1.860	0.26
GrC	1.428	0.26
	1.443	0.26
GrD	1.817	0.26
	1.888	0.26
GrE	0.696	0.26
	0.748	0.26

For Orders and Inquiries, please contact:

Monobind Inc.
138 North Prairie Blvd
Lake Forest, IL 60045 USA

Tel: 848-081-2885
Fax: 848-081-5838
Email: info@monobind.com
Código Web: www.monobind.com

Please visit our website to learn more about our other laboratory products and services.



Indicaciones y aplicaciones
Los productos de laboratorio de Monobind están diseñados para ser usados en sistemas de laboratorio, manuales y automatizados. Accutest y Accutest son compatibles cualquier instrumentación de sistema abierto incluyendo analizadores químicos, lectores de microplaca y lectores de microplaca. Es posible que exista o no un desarrollo de aplicación para su instrumento en particular, para estos casos, se recomienda visitar la sección de instrumentos de nuestro sitio en la web o comunicarse con info@monobind.com.

Monobind ofrece diversos instrumentos, incluyendo el lector de placa Impulse 2, el lector de ELISA diseñado para ser utilizado simultáneamente con nuestros productos y capaz de una calibración de dos puntos. Visite nuestro sitio en la web para obtener mayor información.

Anexo 11. Artículos seleccionados según el algoritmo.

N°	Autor	Año	Base de datos	Título en inglés	Título en español
1	Forga Llenas ¹	2021	Pubmed	Hirsutism. Diagnostic and therapeutic approach.	Hirsutismo. Enfoque diagnóstico y terapéutico.
2	Hernández et al ⁴	2020	Elsevier	Hirsutism and hyperandrogenic states	Hirsutismo y estados hiperandrogénicos.
3	Naranjo et al ⁵²	2015	Pubmed	Clinical evaluation of terminal body hair and prevalence of hirsutism in university students in the city of Manizales. Biohealth	Evaluación clínica de vello corporal terminal y prevalencia de hirsutismo en estudiantes universitarias de la ciudad de Manizales. Biosalud
4	Juszcza et al ⁶¹	2022	Scielo	Síndrome de Cushing. University Hospital Birminngha NHS Foundation Trust. EEUU	Síndrome de Cushing. Fideicomiso de la Fundación NHS del Hospital Universitario Birminngha. Estados Unidos
5	Khattak ⁷³	2021	Google académico	Comparison of free androgen index in polycystic ovary syndrome and non-polycystic ovary syndrome infertile patients. J Ayub Med Coll Abbottabad	Comparación del índice de andrógenos libres en pacientes infértiles con síndrome de ovario poliquístico y síndrome de ovario no poliquístico. J Ayub Med Coll Abbottabad
6	Franik et al ⁷⁴	2018	Lilacs	Hormonal and metabolic aspects of acne vulgaris in women with polycystic ovary syndrome. Eur Rev Med Pharmacol Sci	Aspectos hormonales y metabólicos del acné vulgar en mujeres con síndrome de ovario poliquístico. Eur Rev Med Pharmacol Sci

7	Vázquez ⁷⁵	2016	Pubmed	Clinical, hormonal and ultrasound correspondence in the diagnosis of polycystic ovary syndrome. Cuban Journal of Endocrinology	Correspondencia clínica, hormonal y ecografía en el diagnóstico del síndrome de ovarios poliquísticos. Revista Cubana de Endocrinología
8	Lemos et al ⁶⁷	2021	Pubmed	Dehydroepiandrosterone sulfate levels. Endocrinology / Metabolism	Niveles de sulfato de dehidroepiandrosterona. Endocrinología / Metabolismo.
9	Hernández et al ⁷⁶	2016	Scielo	Endocrinology Cortisol: laboratory measurements and clinical application Cortisol.Medicine & Laboratory.	Endocrinología Cortisol: mediciones de laboratorio y aplicación clínica Cortisol. Medicina & Laboratorio.
10	Jarro ⁵⁹	2022	Pubmed	Current trends in congenital adrenal hyperplasia, a review of the literature. Journal of America Health. Guayaquil. Ecuador.	Tendencias actuales de la hiperplasia adrenal congénita, una revisión de la literatura. Journal of America Health. Guayaquil. Ecuador.
11	Arley ⁶⁰	2022	Scielo	Polycystic ovary syndrome. University of Ibero-America, San José, Costa Rica Sinergia Medical Magazine.	Síndrome de ovario poliquístico. Universidad de Iberoamérica, San José, Costa Rica Revista Médica Sinergia.
12	Badawy et al ⁷⁸		Pubmed	Androstenedione (a Natural Steroid and a Drug Supplement): A Comprehensive Review of Its Consumption, Metabolism, Health Effects, and Toxicity with Sex Differences. Molecules.	Androstenediona (un esteroide natural y un suplemento farmacológico): una revisión completa de su consumo, metabolismo, efectos sobre la salud y toxicidad con diferencias de sexo. Moléculas.

13	Castellano et al ⁶²	2022	Elsevier	Testosterone in menopausal cogender women. Bioscience. Artigo Magazine	Testosterona en mujeres cogenero menopáusicas. Bioscience. Revista Artigo
14	Campostrini et al ⁶³	2023	Lilacs	Testosterone use in women. RSAEGRE	Uso de testosterona en mujeres. RSAEGRE
15	Granda et al ⁶⁴	2021	Scielo	Anovulation. Causes and health treatments	Anovulación. Causas y tratamientos salud
16	Pinheiro et al ⁶⁵	2021	Elsevier	Importance of 17OH-progesterone dose in SOP.	Importancia de la dosis de 17OH-progesterona en el SOP.
17	Seen ⁶⁶	2021	Pubmed	Androstenedione. Spanish Society of Endocrinology and Nutrition magazine.	Androstenediona. Sociedad española de la revista Endocrinología y Nutrición.
18	Lawrenz et al ⁶⁸	2021	Lilacs	Step-Down of FSH- Dosage During Ovarian Stimulation - Basic Lessons to Be Learnt From a Random zed Controlled Trial. Frontiers in endocrinology.	Reducción de la dosis de FSH durante la estimulación ovárica: lecciones básicas que se deben aprender de un ensayo controlado aleatorio. Fronteras en endocrinología.
19	Kawakita ⁶⁹	2023	Google académico	Associations of LH and FSH with reproductive hormones depending on each stage of the menopausal transition. BMC - 2 women's health.	Asociaciones de LH y FSH con hormonas reproductivas dependiendo de cada etapa de la transición menopáusica. BMC - 2 salud de la mujer.
20	Echeverria ⁷⁰	2019	Elsevier	Pathophysiology and pathophysiology of HL. Spanish Journal of Medical Sciences.	Fisiopatología y fisiopatología de la LH. Revista Española de Ciencias Médicas.

21	Cortés et al ⁷¹	2018	Google académico	Stress and cortisol: implications. Cuban Journal of Biomedical Research. Estradiol levels in children and young people. Biosalud Magazine. Colombian	Estrés y cortisol: implicaciones. Revista Cubana de Cuba de Investigaciones Biomédicas.
22	Aguillón et al ⁷²	2019	Elsevier	Estradiol levels in children and young people. Biosalud Magazine. Colombian	Niveles de estradiol en niños y jóvenes. Revista Biosalud. Colombiana
23	Fitzgerald ⁵¹	2021	Pubmed	Hirsutism and virilization. Large Medicine Magazine	Hirsutismo y virilización. Revista Medicina Large