



PROGESTERONA
Código: 4825-300

PROPÓSITO:

La determinación cuantitativa de concentración de Progesterona en suero o plasma humano mediante un análisis de inmuno-enzimático de microplaca.

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

La medición de Progesterona en suero o plasma es considerado el camino más confiable para evaluar su tasa de producción.

La progesterona es una hormona esteroide, la cual juega un papel importante en la preparación para y el mantenimiento en el embarazo. Esta es sintetizada a partir del colesterol vía pregnenolona - luego rápidamente es metabolizada a pregnandiol primario en el hígado. El ovario y la placenta son los sitios de mayor producción; pero una pequeña cantidad es producida por la corteza adrenal. Tanto en hombres como en mujeres. Los niveles circulantes de progesterona, los cuales son característicamente bajos durante la fase folicular, aumenta de una manera rápida durante la fase luteal del ciclo menstrual, alcanzando un pico de LH máximo aproximadamente 5 a 10 días después de la mitad del ciclo. A menos que ocurra el embarazo una disminución abrupta para niveles foliculares se establecen en aproximadamente 4 días antes del siguiente periodo menstrual. Este patrón constituye el uso bien establecido racional de las mediciones de progesterona en suero como un simple método confiable para detección de la ovulación.

Para las mediciones de rutina se prefieren inmunoensayos que usen anticuerpos específicos esteroides. Inicialmente los inmunoensayos para progesterona sérica usaban solventes orgánicos para remover el esteroide de las proteínas de unión endógena tales como globulina unida a corticosteroides (CBG) y albumina. La medición directa de progesterona en suero o plasma es considerada como el método de elección para aplicaciones de rutina. Tanto RIA y ELISA (y algunas FIA) se encuentran disponibles en el mercado. Desde que RIA involucra la manipulación de radiactividad y genera desechos radioactivos, varios métodos no isotópicos lo han reemplazado. Estos métodos usan anticuerpos muy específicos para determinar niveles de progesterona en circulación.

La progesterona ELISA de Monobind usa un anticuerpo anti-progesterona específico y no requiere extracción de muestra de suero o plasma. La reactividad cruzada otros esteroides relacionados estructural y naturalmente es baja.

El empleo de varios sueros de referencia de concentración de progesterona conocida permite la construcción de una gráfica de actividad y concentración. A partir de la comparación de curva dosis respuesta se puede correlacionar la actividad de una muestra desconocida con la concentración de progesterona.

PRINCIPIO

Los reactivos esenciales requeridos para un inmunoensayo enzimático incluyen anticuerpo, conjugado enzima-antígeno y antígeno nativo. Después de mezclar el anticuerpo marcado con biotina, el conjugado enzima-antígeno con un suero que contiene el antígeno nativo, da como resultado una reacción entre el antígeno nativo y el conjugado enzima antígeno por un número limitado de sitios de unión para anticuerpos. La interacción es ilustrada por la siguiente ecuación:



$\text{B}^{\text{m}}\text{Ac}$ = Anticuerpo marcado con biotina (cantidad constante)

Ag = Antígeno nativo (cantidad variable)

Enz Ag = Conjugado enzima-antígeno (cantidad constante)

$\text{Enz Ag}^{\text{B}^{\text{m}}}\text{Ac}$ = Complejo anticuerpo-conjugado enzima antígeno

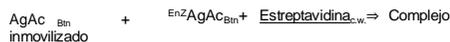
k_a = Tasa Constante de Asociación

k_{-a} = Tasa Constante de Disociación

$k = k_a / k_{-a}$ = constante de equilibrio

Ocurre una reacción simultánea entre la biotina adherida al anticuerpo y la estreptavidina inmovilizada sobre el micro pozo.

Esto efectúa la separación de la fracción unida al anticuerpo después de decantación o aspiración.



$\text{Estreptavidina}_{\text{c.w.}}$ = 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 concentración de antígeno conocida, se puede generar una curva de respuesta de dosis, de la cual se puede hallar la concentración de antígeno desconocida.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

A. Calibradores de Progesterona - 1.0 ml/vial- [Iconos A-G]

Siete (7) viales de referencias para Progesterona a niveles de 0 (A), 0.3 (B), 2.0 (C), 5.0 (D), 15 (E), 30 (F) y 60 (G) en ng/ml. Almacenar de 2-8°C. Un conservante ha sido adicionado. Los calibradores pueden ser expresados en molar (nM/L) multiplicando por 3.18. Por ejemplo 1 ng/ml x 3.18 = 3.18 nM/l

B. Reactivo Enzima de Progesterona - 6 ml/vial - icono

Un (1) vial de Progesterona conjugado (análogo)-peroxidasa de rábano picante (HRP) en una matriz estabilizante de proteína con tinción roja. Almacenar de 2-8°C.

C. Reactivo de biotina Progesterona - 6 ml

Una botella de reactivo contiene conjugado anti-progesterona IgG de conejo purificado marcado con biotina en búfer, tinción amarilla y conservante. Almacenar de 2-8°C

D. Placa recubierta de estreptavidina 96 pozos- icono

Una microplaca de 96 pozos revestida con 1.0 µg/ml de estreptavidina y empaquetada en una bolsa de aluminio con un agente de secado. Almacenar a 2-8°C.

E. Solución de Lavado concentrada - 20 ml - icono

Un vial que contiene un surfactante en búfer salino. Un conservante ha sido adicionado. Almacenar a 2-30°C.

F. Reactivo Sustrato - 12 ml/vial- icono S

Una (1) botella que contiene tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en búfer. Almacenamiento de 2-8°C.

G. Solución de parada-8 ml/vial icono

Un vial que contiene un ácido fuerte (H₂SO₄) almacenar de 2-30°C

H. Inserto del producto

Nota 1: No use reactivos que hayan pasado la fecha de expiración.

Nota 2: Los reactivos una vez abiertos son estables durante sesenta (60) días al almacenar de 2-8°C.

Nota 3: Los reactivos mencionados son para una microplaca de 96 pozos.

Materiales requeridos (no suministrados)

- Pipeta(s) de 25 y 50 µl 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%
- Dispensador de volumen ajustable 200 a 1000µl
- Lavador de microplaca o una botella de lavado (opcional).
- Luminómetro
- Papel absorbente para secado de los pozos de la microplaca.
- Cubierta plástica o de microplaca para los pasos de incubación.
- Aspirador al vacío (opcional) para los pasos del lavado.
- Cronómetro
- Materiales de control de calidad.

PRECAUCIONES

Para uso Diagnóstico in Vitro

No para el Uso Interno ni 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 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 séricos de humanos serán manejados como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades. Las buenas prácticas del 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 Biomédicos", 2da Edición, 1988 HHS.

PREPARACION Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se deben emplear las precauciones en la recolección de muestras por punción venosa para las muestras de suero, plasma heparinizado o sangre. Se deben obtener muestras de suero en ayunas para establecer valores normales con el fin de hacer una comparación más exacta. La sangre se recolecta por punción venosa en un tubo de tapa roja sin aditivos 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 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 -20°C por hasta 30 días. Evitar ciclos de congelación y descongelación. Cuando ensayamos en duplicado, se requiere 0.050ml de las muestras.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. Buffer de Lavado

Diluir los contenidos de la solución de Lavado a 1000 ml con agua destilada o desionizada en un contenedor de almacenamiento adecuado. Almacenar a temperatura ambiente de 20-27°C hasta 60 días.

Nota: no emplear sustrato de trabajo si su apariencia es azul

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

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

- Formatear los pozos de la microplaca para cada suero de referencia, control y muestras de paciente para que sean ensayadas en duplicado. **Regresar cualquier tira de micropozos no usada a la bolsa de aluminio, sellarla y almacenarla a 2-8°C.**
- Pipetear 0.025 ml (25µl) del suero de referencia, control o muestra dentro del pozo asignado.
- Adicionar 0.050ml (50µl) de Reactivo de enzima de Progesterona a cada pozo.
- Agitar la microplaca suavemente por 10-20 segundos para mezclar.
- Adicionar 0.050ml (50 µl) de reactivo de biotina Progesterona a todos los pozos.
- Agitar la microplaca suavemente por 10 a 20 segundos para mezclar
- Cubrir e Incubar 60 minutos a temperatura ambiente.
- Descartar los contenidos de la microplaca por decantación o aspiración. Si se realiza decantación, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Adicionar 350µl 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 automático o manual puede ser usado. Seguir las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se usa una botella, llene cada pozo descomprimiendo los contenedores (evitar las burbujas de aire). Decantar el lavado y repetir 2 veces adicionales.**

- Adicionar 0.100 ml (100µl) de solución sustrato a todos los pozos. **Siempre adicione los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias el tiempo de reacción entre pozos.**
- Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos.
- Adicionar 0.50ml (50µl) de solución de parada a cada pozo y mezcle suavemente de 15 a 20 segundos. **Siempre adicione los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias el tiempo de reacción entre pozos.**
- 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 30 minutos después de adicionar la solución de parada.**

Nota: Diluir las muestras sospechosas de concentraciones mayores de 60ng/ml 1: 5 y 1:1.0 con el calibrador 0 pg/ml de Progesterona o un pool de suero de pacientes masculinos con un valor bajo conocido de progesterona.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio ensayara 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 graficas 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 cambio no notificado 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 Progesterona en muestras desconocidas.

- Registrar las absorbancias obtenidas del lector de microplacas como se muestra en el Ejemplo 1
- Graficar las absorbancias para cada suero de referencia por duplicado versus la concentración de Progesterona correspondiente en ng/ml sobre un papel de gráfica lineal.
- Sacar la mejor curva de ajuste a través de los puntos de la grafica.
- Para determinar la concentración de Progesterona 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 ng/ml) del eje horizontal del gráfico (los duplicados de los desconocidos pueden ser promediados como se indica). En el siguiente ejemplo, el promedio de absorbancias (0.517) del paciente intersecta la curva de calibración en una concentración de Progesterona (08.1 ng/ml) (ver figura 1)

PARAMETROS DE C. C.

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

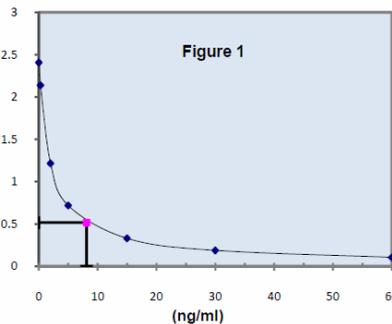
- Las absorbancias del calibrador 0 ng/ml deben ser \geq a 1.
- 4 de 6 grupos de control de calidad estarán dentro de los rangos establecidos

EJEMPLO 1



Muestra	Numero de pozo	Abs (A)	Abs Media (B)	Valor (ng/ml)
Cal A	A1	2.420	2.406	0
	B1	2.391		
Cal B	C1	2.155	2.137	0.3
	D1	2.119		
Cal C	E1	1.248	1.215	2.0
	F1	1.183		
Cal D	G1	0.721	0.719	5.0
	H1	0.717		
Cal E	A2	0.338	0.330	15.0
	B2	0.322		
Cal F	C2	0.187	0.188	30.0
	D2	0.190		
Cal G	G2	0.107	0.105	60.0
	H2	0.104		
Paciente 1	A3	0.525	0.517	8.1
	B3	0.510		

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



ANÁLISIS DE RIESGOS

A. Desempeño del análisis

- Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo sea mantenido en forma constante para obtener resultados reproducibles.
- El pipeteo de las muestras no se extenderá más de 10 minutos para evitar derivar el análisis.
- No se deben emplear muestras altamente lipémicas, hemolizadas o contaminadas.
- Si más de 1 placa es usada, se recomienda repetir la curva de respuesta a la dosis.
- La adición de la solución sustrato inicia una reacción cinética, 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 derivación de tiempo durante la reacción.
- Los lectores de placa realizan mediciones verticalmente. No tocar el fondo de los pozos.
- La falla al remover solución adherida en los pasos de aspiración o decantación puede resultar en replicación baja y resultados incorrectos.
- Usar los componentes del mismo grupo no mezclar los reactivos de diferentes conjuntos.
- Es esencial un pipeteo preciso y exacto así como seguir el tiempo exacto y la temperatura requerida. Cualquier desviación de las instrucciones de uso puede arrojar resultados inexactos.
- 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.

- Es importante calibrar todos los equipos, por ejemplo: pipetas, lectores, lavadores y/o instrumentos automatizados con este reactivo y realizar un mantenimiento preventivo rutinario
- El análisis de riesgo – como lo requiere la directiva IVD 98/79/EC de la marca CE- para estos y otros dispositivos elaborados por Monobind, pueden ser solicitados vía Email: Monobind@monobind.com

B. Interpretación

- Los resultados de laboratorio por si solo son únicamente un aspecto para determinar el cuidado del paciente y no deben ser la única base para una terapia, particularmente si los resultados están en conflicto con otros determinantes.
- Para resultados de pruebas válidas, los controles adecuados y otros parámetros deben estar dentro de los rangos listados y requerimientos del ensayo.
- 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.
- Si se utiliza el sistema de reducción de datos controlados 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 Progesterona AccuBind Elisa son descritos en la tabla 1

	(ng/ml)	(nmol/L)
Niños (1-10 yr)	0.07 – 0.52	0.2-1.7
Hombres adultos	0.13 – 1.22	0.4 – 3.88
Mujeres adultas		
Fase folicular	0.15 – 1.40	0.5 – 4.4
Fase luteal	2.0 – 25.0	6.4 – 79.5
Mujeres embarazadas		
Primer trimestre	7.25 – 90.0	23 – 286
Segundo trimestre	19.5 – 91.0	62 – 289
Tercer trimestre	49.0 – 422.0	153 – 1342
Mujeres postmenopausicas	0.0 – 0.80	0.0 – 2.55

Durante el embarazo los niveles séricos de Progesterona se incrementan rápidamente hasta finalizar el tercer trimestre.

Es importante guardar en mente 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" es dependiente de una multiplicidad de factores: la especificidad del método, la población probada y la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio dependerá bajo el rango de valores esperados establecidos por el fabricante solamente hasta que se pueda determinar un rango para laboratorio por los analistas usando el método con una población local para el área en la cual el laboratorio está ubicado.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

A. Precisión

Las precisiones dentro y entre ensayos del sistema de pruebas de Progesterona ELISA, para microplaca fueron determinadas por análisis en 3 diferentes niveles de suero de control. El número, valor medio, la desviación estándar y el CV para cada uno de estos sueros controles son presentados en la Tabla 2 y Tabla 3.

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

MUESTRA	N	X	σ	C.V.
Bajo	20	1.0	0.093	9.3%
Normal	20	11.1	0.344	3.1%
Alto	20	40.5	1.155	2.9%

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

MUESTRA	N	X	σ	C.V.
Bajo	10	1.1	0.10	9.9%
Normal	10	10.8	0.76	7.0%
Alto	10	39.2	2.18	5.6%

* Medido en 10 experimentos en duplicado durante 10 días.

B. Exactitud

El sistema ELISA™ Monobind de Progesterona fue comparado con un método de inmunoenálisis de quimioluminiscencia. Se utilizaron muestras biológicas de poblaciones con niveles de Progesterona bajo, normal y alto (el rango de valores fue <0.15 ng/ml-128ng/ml). El número total de las muestras fue de 60. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 4

TABLA 4

Método	Media (X)	Ultimo Análisis De regresión Cuadrada	Coefficiente de Correlación
Este método(y)	14.59	$y = -1.223 + 1.018(x)$	0.989
Referencia(x)	15.53		

Solo pequeñas cantidades de desviación entre el sistema de Progesterona ELISA™ y el método de referencia se indican por la proximidad de los valores medios. La ecuación de regresión cuadrada y el coeficiente de correlación indican un excelente acuerdo del método.

C. Sensibilidad

Esta prueba tiene una sensibilidad de 0.105 ng/ml. La sensibilidad fue hallada determinando la variabilidad del calibrador de suero 0 pg/ml y usando 2 σ estadísticas (95% certeza) para calcular la dosis mínima.

D. Especificidad

El % de reactividad cruzada del anticuerpo de Progesterona para sustancias seleccionadas se evaluó mediante la adición de sustancias de interferencia a una matriz de suero con las siguientes concentraciones. La reactividad cruzada se calculo derivando el ratio entre la dosis de sustancia de interferencia y la dosis de Progesterona necesaria para desplazar la misma cantidad del análogo marcado.

Sustancia	Reactividad Cruzada
Progesterona	100.000
17 OH	0.375
progesterona	0.158
Androstenediona	0.014
Cortisona	0.347
Corticosterona	0.005
Cortisol	0.003
Danazol	0.006
Dihidotestosteronal	0.002
DHEA sulfato	0.004
Estradiol	0.003
Estrona	0.002
Estrilol	0.023
Prednisona	0.015

REFERENCIAS

- Abraham GE. The application of natural steroid radioimmunoassay to gynecologic endocrinology. In: Abraham GE, editor. *Radioassay Systems in Clinical Endocrinology*. Basel: Marcel Dekker; 476-529 (1981).
- Auffrere MB, Benson H. Progesterone: an overview and recent advances. *Fertility Sterility*; 65:783-800 (1976).
- Bauman J. Basal body temperature: unreliable method of ovulation detection. *Fertility Sterility*; 36:729-33. (1981).
- Brown JB. Timing of ovulation. *Med J Austral*; 2:780-3 (1977).
- Gautray JP, et al. Clinical investigation of the menstrual cycle: clinical, endometrial and endocrine aspects of luteal defects. *Fertility Sterility*; 35:296-303 (1981).
- Hensleigh PA, Fairstat T. Corpus luteum dysfunction: serum progesterone levels in diagnosis and assessment of therapy for recurrent and threatened abortion. *Fertility Sterility*; 32:396-9. (1979).
- Hernandez JL, et al. Direct evidence of luteal insufficiency in women with habitual abortion. *Obstetric Gynecology*; 49:705-8 (1977).
- Jones G. Luteal phase defects. In: Behrman SJ, Kistner RW, editors. *Progress in Infertility*. Boston: Little, Brown and Company, 2nd ed., 1975: 299-324.

- Klopper A, Fuchs F. Progesteragens. In: Fuchs F, Klopper A, editors. *Endocrinology of Pregnancy*. Hagerstown: Harper & Row; 99-122 (1977).
- Lehmann F, Bettendorf G. The endocrine shift from a normal cycle to anovulation. In: Insler V, Bettendorf G, editors. *Advances in Diagnosis and Treatment of Infertility*. Amsterdam: Elsevier/North Holland, 105-13 (1981).
- March CM. Luteal phase defects. In: Mishell DR, Davajan V, editors. *Reproductive Endocrinology, Infertility and Contraception*. Philadelphia: F. A. Davis Company, 469-76. (1979).
- March CM, Goebelsmann U, Nakamura RM, Mishell DR. Roles of estradiol and progesterone in eliciting the midcycle luteinizing hormone and follicle stimulating hormone surges. *J Clin Endocrinol Metab*; 49:507-13 (1979).
- BIO-ED slide/seminar educational program. Rochester: Bioeducational Publications (1981).
- Radwanska E, et al. Plasma progesterone and estradiol estimations in the diagnosis and treatment of luteal insufficiency in menstruating infertile women. *Acta Eur Fertilit*; 7:39-47 (1976).
- Radwanska E, et al. Plasma progesterone levels in normal and abnormal early human pregnancy. *Fertility Sterility* 30:398-402 (1978).
- Radwanska E, et al. Single midluteal progesterone assay in the management of ovulatory infertility. *J Reprod Med*; 28:65-9 (1981).
- Tietz. *Textbook of clinical chemistry*, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, (1994).

Revisión: 4 Fecha: 112210 Cat #: 4825-300
For Orders and Inquiries, please contact



Tel: 949-951-2685
Fax: 949-951-3539
Email: info@monobind.com
On the Web: www.monobind.com

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



Instrumentos y aplicaciones

Los productos de inmunoensayo de Monobind están diseñados para que funcionen en ambientes de laboratorios manuales y automatizados. AccuBind y Acculite son compatibles cualquier instrumentación de extremo abierto incluyendo analizadores químicos, lectores de microplacas y lavadores de microplacas. 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 techsupport@monobind.com

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