

PROGESTERONA

Progesterona (Elisa)

Uso Previsto:

El ensayo de progesterona es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa in vitro de la concentración de progesterona en suero humano. Solo para uso profesional.

Resumen:

El gestágeno progesterona es una hormona esteroide que se forma principalmente en las células del cuerpo lúteo y durante el embarazo en la placenta. La concentración de progesterona se correlaciona con el desarrollo y la regresión del cuerpo lúteo. Mientras que la progesterona es apenas detectable en la fase folicular del ciclo femenino, se observa un aumento en el nivel de progesterona un día antes de la ovulación. Durante la fase lútea se produce un aumento de la síntesis de progesterona. En la segunda mitad del ciclo, el pregnanediol se excreta en la orina como principal producto de degradación de la progesterona.¹ La progesterona provoca la conversión de la mucosa uterina en un tejido rico en glándulas (fase de secreción), con el fin de prepararla para la implantación intrauterina del óvulo fecundado. Durante el embarazo, la progesterona inhibe la contracción del miometrio. En la glándula mamaria, la progesterona (junto con los estrógenos) promueve la proliferación, secreción y disposición de los alvéolos.^{2,3,4,5}

La detección de progesterona se utiliza en el diagnóstico de fertilidad para la detección de la ovulación y la evaluación de la fase lútea.⁶

Principio de Prueba:

Duración total del ensayo: 80 minutos.

- Se combinan la muestra, los micropocillos recubiertos con derivados de progesterona y los anticuerpos de progesterona marcados con enzimas.
- Durante la incubación, el derivado de progesterona que recubre los micropocillos y la progesterona presente en la muestra compiten por unirse a los anticuerpos marcados con la enzima.
- Después del lavado, se genera un complejo entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a enzimas por reacciones inmunológicas.
- Luego se agrega la solución de sustrato y este complejo la cataliza, lo que da como resultado una reacción cromogénica. La reacción cromogénica resultante se mide como absorbancia.
- La intensidad del color es inversamente proporcional a la cantidad de progesterona en la muestra

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pozos. Recubierta con derivado de progesterona.
- Calibradores, 6 viales, 1 mL cada uno, listos para usar; con concentraciones indicadas en cada envase.
- Conjugado de enzima de progesterona: 1 vial, 6,0 ml de progesterona monoclonal de oveja marcada con HRP (peroxidasa de rábano picante) en tampón Tris-NaCl que contiene BSA (albúmina de suero bovino). Contiene 0,2% de conservante ProClin300.
- Sustrato, 1 vial, 11mL, listo para usar, (tetrametilbencidina) TMB.
- Solución de parada, 1 vial, 6,0 mL de ácido sulfúrico 1 mol/L.
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial, 25 ml (concentrado 40X), solución de lavado PBS-Tween.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 620 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministran 50 µl con una precisión superior al 1,5 %.
- Papel absorbente.
- Agua desmineralizada.

Precauciones y Advertencias:

- Sólo para uso diagnóstico in vitro.
- Tome las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos de laboratorio.
- La eliminación de todos los materiales de desecho debe realizarse de acuerdo con las pautas locales.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Todos los desechos de muestras y reacciones deben considerarse potencialmente biopeligrosos. La manipulación de las muestras y los residuos de la reacción debe realizarse de acuerdo con las normativas y directrices locales.
- La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que puede causar quemaduras graves. En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
- Los ácidos neutralizados y otros desechos líquidos deben descontaminarse agregando un volumen suficiente de hipoclorito de sodio para obtener una concentración final de al menos 1,0%. Puede ser necesaria la exposición a hipoclorito de sodio al 1,0 % durante 30 minutos para garantizar una descontaminación eficaz.

- Algunos reactivos contienen 0,05%-0,2% ProClin 300 que puede causar sensibilización por contacto con la piel, por lo que debe evitarse. Los reactivos y sus recipientes deben desecharse de forma segura. En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstrese la etiqueta o el envase.
- El sustrato tiene un efecto irritante sobre la piel y las mucosas. En caso de posible contacto, lavar los ojos con abundante agua y la piel con jabón y abundante agua. Lave los objetos contaminados antes de reutilizarlos. Si es inhalado, lleve a la persona al aire libre.
- Para obtener información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit, consulte la Hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS), que está disponible a pedido.
- No fume, beba, coma ni se aplique cosméticos en el área de trabajo.
- No pipetear con la boca. Use ropa protectora, guantes desechables y protección para los ojos y la cara al manipular muestras y reactivos. Lávese las manos después de su uso.
- Si alguno de los reactivos entra en contacto con la piel o los ojos, lavar abundantemente la zona con agua.

Almacenamiento y Estabilidad:

- Almacenar a 2-8°C.
- Selle y devuelva los reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones se mantendrá la estabilidad durante 2 meses o hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, lo que ocurra primero.

Recolección y Preparación de muestras:

- Se recomienda suero humano para este ensayo.
- Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C por no más de 8 horas. Estable durante 7 días a 2-8°C y 1 mes a -20°C. Congelar una sola vez.
- No utilice muestras inactivadas por calor.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba, por lo que se deben eliminar mediante centrifugación. Asegúrese de que se haya formado completamente el coágulo en las muestras de suero antes de la centrifugación.
- Evite muestras muy hemolíticas, lipémicas o turbias.

Calibración:

El ELISA de progesterona se ha estandarizado frente al ensayo Elecsys Progesterone III, que se puede rastrear a través de ID-GC/MS (cromatografía de gases de dilución de isótopos/espectrometría de masas) a progesterona altamente purificada ponderando de forma análoga a BCR-348R y ERM-DA347.6 Se recomienda recalibrar cuando se utiliza un nuevo lote de reactivo, o los controles de calidad estén fuera del rango especificado.

Control de Calidad:

Cada laboratorio debe tener controles de ensayo a niveles en el rango bajo, normal y elevado para monitorear el rendimiento del ensayo. Los controles deben tratarse como desconocidos y los valores deben determinarse en cada procedimiento de prueba realizado. El requisito de control recomendado para este ensayo es utilizar control de veracidad por separado y analizarlos junto con las muestras en la misma serie. El resultado es válido si los valores de control se encuentran dentro de los rangos de concentración impresos en las etiquetas.

Solución de Lavado (Dilución 40X):

Agregue agua desionizada al concentrado de solución de lavado concentrado 40X. Diluya 25 ml de solución de lavado concentrada con 975 ml de agua desionizada hasta un volumen final de 1000 ml. Estable durante 2 meses a temperatura ambiente.

Procedimiento de Prueba:

Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de la medición. Mezcle todos los reactivos invirtiéndolos suavemente antes de usarlos.

- Utilice solo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada calibrador y muestra que vaya a analizar.
- Agregue 50 µL de calibradores o muestras a cada pocillo.
- Agregue 50 µL de conjugado enzimático a cada pocillo.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con una tapa para placas e incube a 37°C durante 60 minutos.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si se decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Agregue 350 µL de solución de lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repita 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Se puede utilizar un lavador automático de tiras de microplacas. Al final del lavado, invierta la placa y saque la solución de lavado residual sobre papel absorbente.
- Agregue 100 µL de sustrato a cada pocillo.
- Cubra e incube a temperatura ambiente (18-25°C) en la oscuridad para que reaccione durante 20 minutos. No agite la placa después de agregar el sustrato.
- Agregue 50 µL de solución de parada a cada pocillo.
- Agite durante 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Es importante asegurarse de que el color azul cambie a amarillo por completo.
- Lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (usando de 620 a 630 nm como longitud de onda de referencia para minimizar las imperfecciones de los pocillos) en un lector de microplacas. Los resultados deben leerse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Cálculo:

- Registre la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas.
- Calcule la absorbancia media de cualquier medición duplicada y utilice la media para el siguiente cálculo.

• Grafique el logaritmo común de absorbancia frente a la concentración en ng/mL para cada calibrador.
 Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados en papel cuadrículado lineal. Se sugiere el método punto a punto para generar una curva de calibración.
 Los siguientes datos son solo para demostración y no se pueden usar en lugar de las generaciones de datos en el momento del ensayo:

Muestra	Valor (ng/mL)	Absorbancia
Calibrador A	0	2.784
Calibrador B	0.5	2.128
Calibrador C	2.5	1.557
Calibrador D	10	0.946
Calibrador E	30	0.439
Calibrador F	60	0.189
Control 1	1.43	1.862
Control 2	14.42	0.834
Muestra	3.97	1.437

Limitaciones e Interferencias:

- El ensayo no se ve afectado por ictericia (diurato de bilirubina < 923 µmol/L o < 54 mg/ dL), hemólisis (Hb < 0,621 mmol/L o < 1,0 g/dL), lipemia (Intralipid < 720 mg/ dL).
- Criterio: Recuperación dentro del ± 10 % del valor inicial.
- No se ha establecido el rendimiento de esta prueba con muestras neonatales.
- No se observó interpretación de factores reumatoides hasta una concentración de 2000 UI/mL.
- En casos raros, pueden ocurrir interferencias debido a títulos extremadamente altos de anticuerpos contra anticuerpos específicos del analito. Estos efectos se minimizan mediante un diseño de prueba adecuado.
- Para fines de diagnóstico, los resultados siempre deben evaluarse junto con el historial médico del paciente, el examen clínico y otros hallazgos.

Cálculo:

El analizador calcula automáticamente la concentración de analito de cada muestra (ya sea en nmol/L, ng/mL o µg/L).

Factores de Conversión:

nmol/L x 0,314 = ng/mL (µg/L) ng/mL x 3,18 = nmol/L

Rango de Medición:

0,05-60 ng/mL o 0,159-190,8 nmol/L (definido por el límite inferior de detección y el máximo de la curva maestra). Los valores por debajo del límite de detección se reportan como <0,05 ng/mL o <0,159 nmol/L. Los valores por encima del rango de medición se notifican como >60 ng/mL o >190,8 nmol/L.

Límite Inferior de Detección:

0,05 ng/mL o 0,159 nmol/L

El límite de detección representa el nivel de analito más bajo que se puede distinguir de cero. Se calcula como el valor que se encuentra dos desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (calibrador maestro, estándar 1+2 SD, estudio de repetibilidad, n=21)

Valores Esperados:

Sensibilidad Funcional:

0,08 ng/mL o 0,254 nmol/L

La sensibilidad funcional es la concentración de analito más baja que se puede medir de forma reproducible con un CV de precisión intermedia de ≤ 20 %.

Hombres: 0,20-1,2 ng/mL

Mujeres:

- Fase folicular 0.15-1.7 ng/mL
- Fase de ovulación 0.75-5.9 ng/mL
- Fase lútea 1,7-25 ng/mL

Datos de Rendimiento Específicos:

Los datos de rendimiento representativos se dan a continuación. Los resultados obtenidos en laboratorios individuales pueden diferir.

Precisión:

La precisión se determinó usando reactivos, sueros humanos agrupados y controles en un protocolo modificado (EP5-A) del CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio): 2 veces al día durante 20 días (n = 40). Los siguientes resultados fueron obtenidos:

Muestra	Reproducibilidad			Precisión Intermedia	
	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %	SD ng/mL	CV %
Suero 1	0.82	0.073	8.93	0.278	9.33
Suero 2	5.56	0.299	5.38	0.443	7.97
Suero 3	26.22	1.088	4.15	1.539	5.87
PC Universal 1	1.43	0.097	6.75	0.087	6.09
PC Universal 2	14.42	0.069	4.64	0.766	5.31

*Reproducibilidad= Precisión dentro de la ejecución

Comparación de Métodos:

Una comparación del ensayo de progesterona (y) con Elecsys Progesterone III (x) usando 91 muestras clínicas arrojó las siguientes correlaciones:
 Regresión Lineal.

y = 1,217x - 0,135

r = 0,954

Las concentraciones de la muestra estaban entre aprox. 0,05 y 60 ng/mL.

Especificidad Analítica:

Las siguientes sustancias fueron probadas para la reactividad cruzada en la prueba:

Sustancia	Reacción Cruzada (%)
17α-OH Progesterona	< 0.30
Estriol	< 0.12
Androstenedione	< 0.20
Testosterone	< 0.10
DHEA-S	< 0.02
Cortisol	< 0.02

Sensibilidad Funcional:

0,08 ng/mL o 0,254 nmol/L

La sensibilidad funcional es la concentración de analito más baja que se puede medir de forma reproducible con un CV de precisión intermedia de ≤ 20 %.

Referencias:

1. Johnson MR, Carter G, Grint C, et al. Relación entre esteroides ováricos, gonadotropinas y relaxina durante el ciclo menstrual. Acta Endocrinol 1993;129:121-125.
2. Laufer N, Navot D, Schenker JG. El patrón de progesterona y estradiol plasmáticos en fase lútea en ciclos fértiles. Am J Obstet Gynecol 1982;143:808-813.
3. Veldhuis JD, Christiansen E, Evans WS, et al. Perfiles fisiológicos de la liberación episódica de progesterona durante la fase lútea media del ciclo menstrual humano: análisis de los ritmos circadianos y ultradianos, propiedades discretas del pulso y correlaciones con la liberación simultánea de hormona luteinizante. J Clin Endocrinol Metab 1988;66(2):414-421.
4. Filicori M, Butler JP, Crowley WF Jr. Regulación neuroendocrina del cuerpo lúteo en humanos. J Clin Invest 1984;73:1638-1647.
5. Thienpont L, Siekmann L, Lawson A, et al. Desarrollo, Validación y Certificación por Cromatografía de Gases por Dilución Isotópica-Espectrómetro de Masas de Materiales de Referencia de Suero Humano Liofilizado para Cortisol (CRM 192 y 193) y Progesterona (CRM 347 y 348). Clin Chem 1991;37(4):540-546.
6. Guillaume J, Benjamin F, Sicuranza B, et al. Niveles séricos maternos de estradiol, progesterona y h-choriogonadotropina en el embarazo ectópico y su correlación con los hallazgos histológicos del endometrio Surg Gynecol Obstet 1987;165:9-12.

