

## *Immunoensayo de la Enzima para la Determinación Cuantitativa de la Concentración de Progesterona en Suero Humano*

**Solo para diagnóstico In Vitro**  
**Para uso exclusivo en laboratorios clínicos o de gabinete**  
**Conservar entre 2°C a 8°C**

### NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Immunoensayo de la Enzima de Progesterona

### USO DESTINADO

Para la determinación cuantitativa de la concentración de progesterona en suero humano.

### INTRODUCCIÓN

La progesterona es un esteroide C21 el cual está sintetizado desde el tejido y el colesterol circulante. El colesterol es transformado en pregnenolona la cual es después convertida en progesterona a través de la deshidrogenasa e isomerasa combinada. Los sitios de producción principales son los suprarrenales y ovarios y la placenta durante el embarazo. La mayoría de este esteroide es metabolizado en el hígado en pregnanediol y conjugado como una glucuronida antes de su excreción por los riñones. La progesterona muestra una amplia variedad de efectos orgánicos finales. La función primaria de la progesterona es exhibida por los órganos reproductivos. En hombres, la progesterona es un intermediario necesario para la producción de corticoesteroides y andrógenos. En mujeres, la progesterona permanece relativamente constante a través de toda la fase folicular del ciclo menstrual. La concentración después aumenta rápidamente seguida de la ovulación y permanece elevada por 4 a 6 días y disminuye al nivel inicial 24 horas antes del comienzo de la menstruación. En el embarazo, la producción de progesterona placentar se eleva establemente a niveles de 10 a 20 veces más que aquellos de la cima de la fase lútea.

Las mediciones de progesterona son por lo tanto realizadas para determinar la ovulación así como para caracterizar los defectos de la fase lútea. El monitoreo de la terapia de progesterona y las evaluaciones de la etapa temprana del embarazo comprenden los usos restantes de los análisis de progesterona.

### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La Progesterona EIA está basada en el principio de adherencia/enlace competitivo entre la progesterona en el espécimen de prueba y el conjugado de progesterona-HRP para una cantidad constante de anti-progesterona de conejo. En la incubación, los pozos revestidos de IgG anti-conejo de cabra son incubados con 25 µL de estándares de progesterona, controles, y muestras de paciente, 100 µL de Reactivo de Conjugado de Progesterona-HRP y 50 µL de reactivo anti-progesterona de conejo a temperatura ambiente (18-25°C) por 90 minutos. Durante la incubación, una cantidad fijada de progesterona etiquetada de HRP compite con la progesterona endógena en el estándar, la muestra, o en el suero de control de calidad para un número fijo de sitios de adherencia/enlace del anticuerpo de progesterona específico. Así, la cantidad de conjugado de peroxidasa de progesterona inmunológicamente vinculado

con el pozo disminuye progresivamente conforme la concentración de progesterona en el espécimen aumenta.

El conjugado de peroxidasa de progesterona no vinculada es después removida y los pozos son lavados. Después, una solución de TMB es agregada e incubada a temperatura ambiente por 20 minutos, provocando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de la solución de paro y la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 450nm. La intensidad del color formada es proporcional a la cantidad de enzima presente y está inversamente relacionada con la cantidad de progesterona no etiquetada en la muestra. Una curva estándar es obtenida al trazar la concentración del estándar contra la absorbancia. La concentración de progesterona de las muestras y controles que corren con los estándares, pueden ser calculados desde la curva estándar.

### REACTIVOS

#### **Materiales abastecidos con el equipo de prueba:**

1. Placas de micropozos cubiertos con IgG de Cabra Anti-Conejo con 96 pozos.
2. Estándares de referencia de Progesterona que contienen 0, 0.5, 3.0, 10.0, 25.0 y 50.0 ng/mL. Líquido. Listos para su uso.
3. Reactivo Anti-Progesterona de Conejo (Color Rosa). 1 Frasco.
4. Concentrado de Conjugado de Progesterona HRP (11x). 1 Vial.
5. Diluyente Conjugado de Progesterona HRP. 1 Frasco
6. Reactivo TMB. 1 Frasco.
7. Solución de Paro (1N HCl). 1 Frasco.
8. Solución búfer de lavado concentrado (50X). 1 Frasco.
9. Juego de controles (opcional)

#### **Materiales requeridos pero no abastecidos**

1. Pipetas de precisión 5 µL - 40 µL, 50 µL - 200 µL y 1.0 mL.
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada
4. Mezclador Vórtex o equivalente.
5. Papel absorbente o toalla de papel
6. Papel cuadriculado
7. Un lector de MicroElisa.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

Actualmente no hay métodos de prueba disponibles que puedan ofrecer completa seguridad de que la hepatitis B, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH / HTLV-III / LAV), u otros agentes infecciosos están ausentes de los reactivos del kit. Por lo tanto, todos los productos sanguíneos humanos, incluidas las muestras deben considerarse potencialmente infeccioso. El manejo y disposición deben estar de acuerdo con los procedimientos definidos por las guías nacionales de seguridad de riesgo biológico o el reglamento, en el que existe. (USA Center for Disease Control/National Institute of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984).

### RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

1. Solamente debe ser utilizado suero humano. Ningún pretratamiento especial de la muestra es necesario



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

#### **Distribuido por:**

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.  
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria  
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México  
**Lada sin costo:** 01 800 440 0404 c/ 10 líneas  
**Tel:** 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

- Las muestras de suero deben ser almacenados de 2 - 8 °C por hasta 24 horas, y deben ser congeladas a -10 °C o más bajo para periodos más largos. No utilice muestras excesivamente lipémicas o hemolizadas.
- Nota: Las muestras que contienen azida sódica no deben ser utilizados en el ensayo.
- Nota: Si desea utilizar muestra de plasma favor de revisar el inserto en inglés.

#### ALMACENAMIENTO DE LA PRUEBA E INSTRUMENTACIÓN

Los equipos de prueba sin abrir deben ser almacenados de 2 a 8 °C al ser recibidos y la placa de microtira debe ser guardada en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición al aire húmedo. Los equipos de prueba abiertos permanecerán estables hasta su fecha de caducidad, siempre y cuando sean almacenados como se describió anteriormente. Un lector de placa de microtira con una amplitud de banda de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-3 D.O. o mayor a una longitud de onda de 450 nm es aceptable para su uso en la medición de absorbancia.

#### PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
- Para preparar el **Reactivo de trabajo del conjugado de progesterona** agregue 0.1 mL (100 µL) de **Concentrado de conjugado de Progesterona HRP** (11x) a 1.0 mL de **Diluyente de conjugado de Progesterona HRP** (1:10 dilución) y mezcle bien. La cantidad de conjugado diluido dependerá del tamaño de su ensayo. Deseche el restante después de su uso.
- Diluir un volumen de solución búfer concentrado (50X) en 49 volúmenes de agua destilada. Por ejemplo, diluir 15 ml de solución búfer concentrado (50X) en 735 ml de agua destilada para preparar 750 ml de búfer de lavado (1X). Mezcle bien antes de su uso.

#### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- Asegure el número deseado de pozos cubiertos en el soporte.
- Agregue 25 µL de estándares, muestras y controles en los pozos apropiados.
- Agregue 50 µL de reactivo de conejo anti-progesterona en cada pozo.
- Agregue 100 µL de **Reactivo de trabajo del conjugado de progesterona HRP** en cada pozo.
- Mezcle perfectamente por 30 segundos. Es muy importante mezclar completamente.
- Incube a temperatura ambiente (18 - 25 °C) por 90 minutos.
- Enjuague y sacuda suavemente los micropozos 5 veces con búfer de lavado (1X).
- Agregue 100 µL de Reactivo TMB en cada pozo. Mezcle cuidadosamente por 10 segundos.
- Incube a temperatura ambiente (18 - 25 °C) por 20 minutos.
- Detenga la reacción añadiendo 100 µL de Solución de Paro a cada pozo.
- Mezcle cuidadosamente por 30 segundos. **Es importante asegurarse que el color azul cambie a amarillo completamente.**
- Lea la absorbancia a 450 nm con un lector de MicroPozos en un lapso no mayor a 15 minutos.

#### NOTA IMPORTANTE:

- El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente puede tener poca precisión y absorbancias elevadamente falsas.
- Si existen burbujas dentro de los pozos, se crearán lecturas falsas.

De favor utilice agua destilada para remover las burbujas antes de agregar el sustrato.

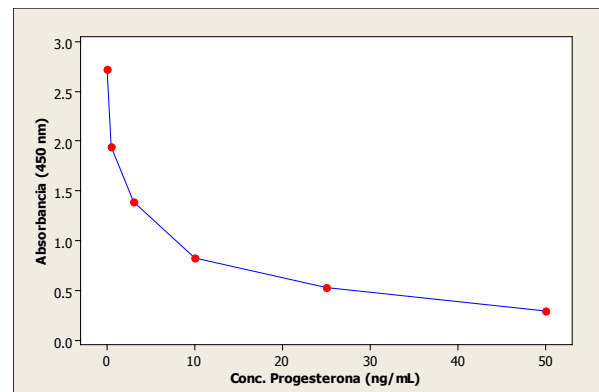
#### CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Calcule el valor de absorbancia media ( $A_{450}$ ) para cada juego de estándares de referencia, especímenes, controles, y muestras de pacientes.
- Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida de cada estándar de referencia comparada con su concentración en ng/mL sobre el papel cuadrícula, con los valores de absorbancia sobre el eje vertical (Y) y las concentraciones sobre el eje horizontal (X).
- Utilizando el valor de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de Progesterona en ng/mL desde la curva estándar.
- En las muestras diluidas el resultado debe ser corregido por el factor de dilución apropiado.

#### EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad óptica a 450 nm mostradas en el eje Y contra las concentraciones de Progesterona mostradas en el eje X. Nota: Esta curva estándar es con el propósito de ilustrar solamente, y no debe ser utilizada para hacer cálculos desconocidos. Cada laboratorio debe obtener sus propios datos y curva estándar en cada experimento.

Progesterona (ng/mL)	Absorción (450 nm)
0	2.719
0.5	1.937
3	1.391
10	0.828
25	0.528
50	0.291



#### VALORES Y SENSIBILIDAD ESPERADOS

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos normales basados en la población de pacientes. La progesterona EIA fue realizada en muestras clínicas de laboratorio en pacientes externos aleatoriamente seleccionadas. La siguiente información es citada de la referencia #9.

<b>Hombres:</b>	adulto	0.13 - 0.97 ng/ml
	pre-pubertal (niños)	0.07 - 0.52 ng/ml
<b>Mujeres:</b>	Fase folicular	0.15 - 0.70 ng/ml
	Fase lútea	2.00 - 25.0 ng/ml
	Post menopausia	0.06 - 1.60 ng/ml

<b>Embarazo:</b>	1er. trimestre	10.3 - 44.0 ng/ml
	2do. trimestre	19.5 - 82.5 ng/ml
	3er. trimestre	65.0 - 229 ng/ml

La detección mínima detectable del ensayo de progesterona en ELISA ha sido medida entre 2 DS del promedio del estándar zero, es estimada de 0.2 ng/ml

## APLICACIONES CLINICAS

### 1. Documentación de ovulación:

El monitoreo de la concentración de progesterona durante el ciclo menstrual es útil en la documentación de la ovulación.

La concentración de la progesterona >3.0 ng/ml será una fuerte evidencia presuntiva de ovulación.

### 2. Niveles de Progesterona Normales vs. Anormales

Niveles mayores a lo normal pueden indicar embarazo. Niveles altos también pueden indicar cáncer de las glándulas suprarrenales o cáncer ovárico, embarazo molar o sobreproducción de hormonas por las glándulas suprarrenales. Sin embargo, los niveles de progesterona son altos durante un embarazo múltiple en comparación al un embarazo sencillo. Niveles menores a lo normal pueden indicar amenorrea. Niveles bajos anormales de progesterona pueden también indicar problemas con la ovulación. En mujeres embarazadas, niveles de progesterona <5 ng/ml pueden indicar amenaza de aborto.

### 3. Embarazo Ectópico:

La progesterona puede ser útil en el diagnóstico de embarazo ectópico. Para valores <25 ng/ml durante el embarazo, la viabilidad del feto necesita ser establecida por ultrasonido. Sin embargo, valores de progesterona <5 ng/ml en el primer trimestre indican embarazo no viable a pesar de la localización del feto.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Al igual que con todas las pruebas de diagnóstico, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una sola prueba, sólo debe ser realizada por el médico después de que los hallazgos clínicos y de laboratorio han sido evaluados.
2. Los estudios han implicado a posibles interferencias en los resultados de inmunoensayo en algunos pacientes que presentan factor reumatoide y anticuerpos antinucleares. Las muestras de suero de pacientes que han recibido infusiones que contienen anticuerpos monoclonales de ratón para fines de diagnóstico o terapéuticos, pueden contener anticuerpos frente a la proteína de ratón (HAMA). Aunque hemos añadido algunos agentes para evitar las interferencias, no se puede garantizar la eliminación de todos los efectos de esta.
3. Los resultados confiables y reproducibles serán obtenidos cuando el procedimiento de ensayo sea llevado a cabo con un completo entendimiento de las instrucciones del inserto en el paquete y con acato a las buenas prácticas de laboratorio.
4. Las muestras de suero que contengan lipemia, hemolisis o turbidez no deberán ser usadas con ésta prueba.
5. Los resultados obtenidos del uso de este equipo de prueba deben ser utilizados solamente como una adición a otros procedimientos diagnósticos e información disponible para el médico.

## REFERENCIAS

1. Radwanska, E., Frankenberg, J., and Allen, E., Plasma progesterone levels in normal and abnormal early human pregnancy. *Fertility and Sterility*, 1978; 30, 398-402
2. Autrere, M.B. and Benson, H. Progesterone: An overview and recent advances, *J. Par. Sci*, 1976;65: 783-800.
3. March, C.M. Goebelsmann, U. Nakamura, R.M. and Mishell, D.R. Jr. Roles of estradiol and progesterone in eliciting the midcycle luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone surges, *J. Clin. Endo. Metab.* 1979;49, 507-513
4. Ross, G.T. Vande Wiele, R.L. and Frantz, A.G. The Ovaries and the breasts. In: Williams, R.H. ed. *Textbook of Endocrinology*. Saunders Company, Philadelphia, 1981: 355-411.
5. Chatteraj, S.C. Endocrine function. In: Tietz, N.W. ed. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Saunders Company, Philadelphia; 1976: 699-823.
6. Shepard, M.K. and Senturia, Y.D. Comparison of serum progesterone and endometrial biopsy for confirmation of ovulation and evaluation of luteal function. *Fertility and Sterility*, 1977; 28: 541-548.
7. Johansson, E.D.B., and Jonasson, L.-E, Progesterone levels in amniotic fluid and plasma from women: I. Levels during normal pregnancy. *Acta Obstet. Gynec. Scand.* 1971;50: 339-343.
8. USA Center for Disease Control National Institute of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 1984.
9. Tietz, N.W. ed. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd. Edition, W.B. Saunders, Co. Philadelphia, 1995: 509-512.

**Diagnóstica**  
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

**FABRICADO POR:**

INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS  
1155 CHESS DRIVE No. 121  
FOSTER CITY, CA 94404 USA