

### INDICACIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático por quimioluminiscencia para la medición cualitativa de progesterona en suero humano. Agente de diagnóstico in vitro, para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

### DESCRIPCION

El ensayo progesterona CLIA, el estándar de progesterona en el suero del paciente es incubado con anticuerpo progesterona y con progesterona-peroxidasa equina conjugada en el pocillo impregnado con anti-raton IgG. En este sistema de fase sólida, el anticuerpo adherido de progesterona permanecerá en el pocillo mientras que la no adherencia será eliminada por lavado. Una reacción de quimioluminiscencia se desarrolla cuando el substrato de CLIA es mezclado con el anticuerpo de la progesterona adherida a la peroxidasa equina. La unidad de luz relacionada (RLU) es proporcional a la cantidad de progesterona des etiquetada de la muestra.

### RESUMEN Y APLICACIÓN

La progesterona (PRG) es una hormona esteroidea cuya función es ayudar al cuerpo de la mujer a prepararse para el embarazo; esta hormona opera junto con otras varias hormonas femeninas. En mamíferos, la progesterona, como todas las otras hormonas esteroideas, es sintetizada a partir de pregnenolona, la cual a su vez deriva del colesterol.

La progesterona ejerce su función primaria a través de los receptores intracelulares de progesterona, aunque un distinto receptor unido a la membrana ha sido también postulado.

La secreción anormal de progesterona ha estado implicada en la tensión premenstrual, expulsión irregular del endometrio, dismenorrea e insuficiencia lútea.

En mujeres, los niveles de progesterona están relativamente bajos durante la fase pre-ovulatoria del ciclo menstrual, sube después de la ovulación y están elevados durante la fase lútea. Los niveles de progesterona son relativamente bajos en niños y en mujeres postmenopáusicas. Las mediciones de los niveles de progesterona pueden ser solicitadas junto con otras pruebas tales como FSH, LH, HCG, perfil tiroideo y pruebas de coagulación, para ayudar a determinar la causa de sangrado uterino anormal en mujeres no embarazadas. Esta prueba mide los niveles de progesterona en sangre.

### CONTENIDO

Kit para la determinación de 96 pruebas:

1. Placa con 96 pozos.
2. Enzima conjugada 1 vial con 5.5 ml.
3. Solución anti-prg 1 vial con 5.5 ml.
4. 6 calibradores con 1 ml, con concentraciones 0, 0.5, 2.5, 10, 30, 90 ng/ml.
5. Sustrato A 6 ml.
6. Sustrato B 6 ml.
7. Control 1 y 2 Liofilizados.
8. PBS-T en polvo (buffer de lavado, 2 bolsas 5 g).
9. 1 bolsa zip-lock.
10. 2 piezas de papel auto-adherible.
11. Instructivo.

### MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

1. Papel absorbente.
2. Lavadora automática de placas de micropozos.
3. Agua destilada.
4. Luminómetro.
5. Agitador magnético.
6. Micropipetas.
7. Agitador de placas.
8. Temporizador.
9. Mezclador Vortex.

### RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Realice la colecta de las muestras de suero de acuerdo con las correctas prácticas médicas.
2. No utilice muestras inactivadas por calor. No utilice preservativos con ácido sódico en las muestras.
3. Los sedimentos y sólidos suspendidos en las muestras pueden interferir con los resultados de la prueba, estos deberán ser removidos por centrifugación. Asegúrese que se ha formado completamente el coágulo en las muestras antes de la centrifugación. Muchas muestras, especialmente aquellas de pacientes con tratamiento con anticoagulantes o terapia trombolítica, pueden presentar un periodo prolongado de coagulación. Si la muestra es centrifugada antes de la formación del coágulo, la presencia de fibrina puede causar resultados erróneos.
4. El lisado de la muestra durante la transportación puede ocasionar resultados bajos.
5. Evite la hemólisis, lipemia o turbidez excesiva.
6. Almacene las muestras a una temperatura entre 15-25°C para no más de 8 horas, para uso en un tiempo mayor a 8 horas y hasta 48 horas almacene entre 2-8°C, o congele las muestras que necesitan ser almacenadas por más de 48 horas a -20°C. Después de descongelar, lleve a temperatura ambiente y mezcle bien por agitación suave.
7. Centrifugue las muestras descongeladas que contengan glóbulos rojos, partículas de materia o aquellas que se vean turbias antes de usar para asegurar la consistencia de los resultados.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso profesional solamente.
2. Seguir las instrucciones de uso cuidadosamente.
3. Maneje los materiales potencialmente contaminados de acuerdo con los requerimientos locales.
4. Cuidado: este ensayo contiene materiales de origen animal. Los componentes bovinos provienen de países donde no se ha reportado BSE (encefalitis espongiforme bovina).
5. No coma, beba, fume ni utilice cosméticos en el área de trabajo.
6. Lave el micropocillo completamente. Cuando realice el lavado, asegúrese de llenar hasta el tope cada micropocillo. La fuerza de inyección de solución de lavado no debe de ser muy intensa para evitar el sobrelavado. Golpee la microplaca contra un papel absorbente para remover las gotas de agua residual.
7. Una falla en la remoción de la solución de lavado puede ocasionar resultados con baja reproducibilidad.
8. No toque o salpique el borde del pocillo con el conjugado.
9. No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad.
10. No utilice ni mezcle componentes de kits con diferentes lotes.
11. El pipeteado de las muestras, calibradores y demás reactivos no deberá de exceder los 10 minutos para evitar la pérdida de señal de reacción.

### ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. Almacene todos los componentes del kit a una temperatura de entre 2°C-8°C. No congele. Evite luz intensa.
2. Coloque los micropozos que no vaya a utilizar en la bolsa zip-lock con los desecantes provistos, después selle la bolsa zip-lock y regresela a 2-8°C, bajo estas condiciones los micropocillos permanecerán estables por 2 meses o hasta la fecha de caducidad, lo que ocurra primero.
3. Selle y regrese los calibradores reconstituidos a la temperatura de entre 2-8°C inmediatamente después de la prueba, bajo estas condiciones la estabilidad permanecerá por 2 meses, para usos prolongados, almacene los calibradores reconstituidos en alícuotas y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelamiento o descongelamiento.
4. Selle y regrese todos los reactivos sin usar a una temperatura entre 2-8°C, bajo estas condiciones la estabilidad será de 2 meses o hasta la fecha de expiración, lo que ocurra primero.

## PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Lleve todos los reactivos a temperatura ambiente (15-25°C) antes de usar, por lo menos por 30 minutos.
2. Determine la cantidad de substrato a emplear y prepárela mezclando volúmenes iguales del substrato A y B en un recipiente limpio. Por ejemplo, agregue 1 mL de substrato A y B para 16 pocillos (quedara un ligero exceso de solución). Deseche la porción no empleada después de 20 minutos de la preparación.
3. Reconstituya cada control con 1 mL de agua destilada y mezcle bien con un Vórtex por 1 minuto. Permita reposar el material reconstituido por lo menos 10 minutos.
4. Agregue 1 bolsa de polvo PBS-T a 500 mL de agua destilada, y mezcle bien con un agitador magnético en un contenedor apropiado. La solución de lavado es estable a temperatura ambiente por 2 meses.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Use solo el número requerido de pocillos y colóquelos en la placa.
2. Agregue 25  $\mu$ L de calibradores, controles o muestras al pocillo asignado.
3. Agregue 50  $\mu$ L de solución anti-PRG a cada pocillo.
4. Agregue 50  $\mu$ L de enzima conjugada a cada pocillo.
5. Cubrir la placa con el papel adherente, incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.
6. Deseche el contenido de los pocillos por decantación o aspiración. Si decanta golpee la placa contra papel absorbente.
7. Agregue 350  $\mu$ L de solución de lavado a cada pocillo, decante o aspire. Repita 4 veces más para un total de 5 lavados. Puede ser usado un lavador automático de microplacas. Al final del lavado golpee la placa contra papel absorbente para eliminar las gotas de agua residual.
8. Agregar 100  $\mu$ L de la mezcla de substratos a cada pocillo.
9. Coloque la placa en el cuarto de detección del Luminómetro por 5 minutos y después lea los RLU's de cada pocillo.

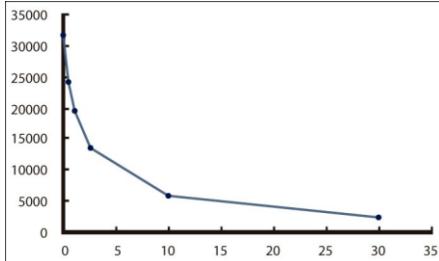
## NOTAS IMPORTANTES

1. Registre los RLU's obtenidos. Calcule la media de los RLU's de cualquier medición por duplicado y use esa media para los siguientes cálculos.
2. Grafique el logaritmo común de los RLU's contra la concentración en ng/ml de cada calibrador.
3. Seleccione el método de curva de 4 parámetros con reducción de datos para generar la curva de calibración usando una computadora.
4. Para determinar la concentración de PRG desconocida de una muestra, localice el logaritmo común de los RLU's de cada muestra en el eje vertical del gráfico, encuentre el punto de intersección en la curva y lea la concentración (ng/ml) del eje horizontal. Si se usa una computadora para determinar la concentración desconocida de una muestra, ingrese el logaritmo común de los RLU's de cada muestra y obtenga la concentración.

## CÁLCULO DE RESULTADOS

Construya una curva estándar trazando el RLU obtenido a partir de cada Standard de referencia en contra de su concentración en  $\mu$ U/ml en papel logarítmico cuadriculado, con valores RLU en la vertical o eje Y y las concentraciones en la horizontal o eje X. Utilice los valores de RLU de cada muestra para determinar la concentración correspondiente de la PRL en  $\mu$ U/ml de la curva estándar. Cualquier espécimen diluido debe ser corregido por el factor de dilución apropiado.

## EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR



## LIMITACIONES DEL ENSAYO

1. Este ensayo es para uso en diagnóstico clínico solamente.
2. Anticuerpos heterófilos y factor reumatoide en las muestras pueden interferir en los resultados. Pacientes expuestos regularmente a animales o sueros de animales puede ser propensos a esta interferencia y valores anormales pueden ser observados.
3. Si los resultados no son consistentes con la evidencia clínica, las pruebas adicionales son recomendadas para confirmar el resultado.

## VALORES DE REFERENCIA

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios rangos de referencia, los cuales pueden ser únicos para cada población y depende de factores geográficos, alimenticios y ambientales.

Intervalo de referencia (ng/mL)	
Hombres	0.1-2
Mujeres con menstruación normal	
Fase folicular	0.2-2.4
Pico del medio ciclo	0.5-3.6
Fase lútea	6-20.5
Mujeres postmenopáusicas	0.1-1.8

## PERFOMANCE

**1. Medición de precisión:** este ensayo está diseñado para tener una precisión Intra-ensayo de <10%. Dos sueros humanos (alto y bajo) fueron probados, usando un lote de reactivos, con 20 repeticiones. Los datos se muestran a continuación:

Suero	Lote	n	Media	SD	%CV
Alto	1	20	2.12	0.07	3.3
Bajo	1	20	8.31	0.36	4.33

Este ensayo fue diseñado para tener una precisión Inter-ensayo de <15%. Fueron usados 3 sueros humanos (bajo, alto, normal) y probados con 3 lotes de reactivos con 2 repeticiones, una vez por día por 20 días. Los datos se muestran en la siguiente tabla:

Suero	n	Media	SD	%CV
Bajo	120	1.75	0.12	6.80
Alto	120	11.74	0.88	7.93
Normal	120	5.86	0.55	9.39

**2. Sensibilidad analítica:** La sensibilidad analítica que es la cierta concentración correspondiente a la media de RLU's de 10 repeticiones del calibrador A menos 2 desviaciones estándar, es de  $\leq 0.25$  ng/ml.

**3. Especificidad analítica:** este ensayo está diseñado para no tener reactividad cruzada con las sustancias enlistadas abajo, a las concentraciones enlistadas, en solución buffer con BSA:

Sustancias	Concentración
Testosterona	20 ng/ml
Estradiol	1000 pg/ml

**4. Medición de precisión por correlación:** un estudio fue realizado en el que las muestras fueron probadas usando este ensayo y un ensayo de PRG por ELISA que se encuentra disponible actualmente en el mercado. Los datos fueron analizados y registrados en la siguiente tabla:

Método de correlación	n	Intercepto	Pendiente	Coeficiente correlación
Regresión lineal	180	0.089	0.9433	0.9712

## REFERENCIAS

1. ALLEN WM. The isolation of crystalline progestin. *Science*. 1935; 82(2118): 89-93.
2. Luconi M, Bonnacorsi L, Maggi M, et al. Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptor son human sperm membrane. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83(3): 877-885.
3. Jang S, Yi LSH. Identification of a 71 kDa protein as a putative non-genomic membrane progesterone receptor in boar spermatozoa. *J. Endocrinol.* 2005; 184(2): 417-425.